

Vergleichende Untersuchungen
zum serologischen Nachweis von Antikörpern
gegen equine Influenzaviren

Otto Michael Schumm

Disbui. München

1989

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie,
Infektions- und Seuchenmedizin
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Dr. h.c. mult. A. Mayr

Vergleichende Untersuchungen
zum serologischen Nachweis von Antikörpern
gegen equine Influenzaviren

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Otto Michael Schumm
aus
Bad Mergentheim

München 1989

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München**

Dekan: Prof. Dr. M. Rüsse

Referent: Prof. Dr. Dr. h.c. mult. A. Mayr

Korreferent: Prof. Dr. M.-A. Hasslinger

Tag der Promotion: 24. Februar 1989

1. Einleitung	1
2. Zielsetzung	2
3. Methodik	3
4. Ergebnisse	4
5. Diskussion	5
6. Zusammenfassung	6
7. Literaturverzeichnis	7
8. Anhang	8
9. Glossar	9
10. Index	10
11. Bibliographie	11
12. Quellenverzeichnis	12
13. Literaturverzeichnis	13
14. Quellenverzeichnis	14
15. Literaturverzeichnis	15
16. Quellenverzeichnis	16
17. Literaturverzeichnis	17
18. Quellenverzeichnis	18
19. Literaturverzeichnis	19
20. Quellenverzeichnis	20
21. Literaturverzeichnis	21
22. Quellenverzeichnis	22
23. Literaturverzeichnis	23
24. Quellenverzeichnis	24
25. Literaturverzeichnis	25
26. Quellenverzeichnis	26
27. Literaturverzeichnis	27
28. Quellenverzeichnis	28
29. Literaturverzeichnis	29
30. Quellenverzeichnis	30
31. Literaturverzeichnis	31
32. Quellenverzeichnis	32
33. Literaturverzeichnis	33
34. Quellenverzeichnis	34
35. Literaturverzeichnis	35
36. Quellenverzeichnis	36
37. Literaturverzeichnis	37
38. Quellenverzeichnis	38
39. Literaturverzeichnis	39
40. Quellenverzeichnis	40
41. Literaturverzeichnis	41
42. Quellenverzeichnis	42
43. Literaturverzeichnis	43
44. Quellenverzeichnis	44
45. Literaturverzeichnis	45
46. Quellenverzeichnis	46
47. Literaturverzeichnis	47
48. Quellenverzeichnis	48
49. Literaturverzeichnis	49
50. Quellenverzeichnis	50
51. Literaturverzeichnis	51
52. Quellenverzeichnis	52
53. Literaturverzeichnis	53
54. Quellenverzeichnis	54
55. Literaturverzeichnis	55
56. Quellenverzeichnis	56
57. Literaturverzeichnis	57
58. Quellenverzeichnis	58
59. Literaturverzeichnis	59
60. Quellenverzeichnis	60
61. Literaturverzeichnis	61
62. Quellenverzeichnis	62
63. Literaturverzeichnis	63
64. Quellenverzeichnis	64
65. Literaturverzeichnis	65
66. Quellenverzeichnis	66
67. Literaturverzeichnis	67
68. Quellenverzeichnis	68
69. Literaturverzeichnis	69
70. Quellenverzeichnis	70
71. Literaturverzeichnis	71
72. Quellenverzeichnis	72
73. Literaturverzeichnis	73
74. Quellenverzeichnis	74
75. Literaturverzeichnis	75
76. Quellenverzeichnis	76
77. Literaturverzeichnis	77
78. Quellenverzeichnis	78
79. Literaturverzeichnis	79
80. Quellenverzeichnis	80
81. Literaturverzeichnis	81
82. Quellenverzeichnis	82
83. Literaturverzeichnis	83
84. Quellenverzeichnis	84
85. Literaturverzeichnis	85
86. Quellenverzeichnis	86
87. Literaturverzeichnis	87
88. Quellenverzeichnis	88
89. Literaturverzeichnis	89
90. Quellenverzeichnis	90
91. Literaturverzeichnis	91
92. Quellenverzeichnis	92
93. Literaturverzeichnis	93
94. Quellenverzeichnis	94
95. Literaturverzeichnis	95
96. Quellenverzeichnis	96
97. Literaturverzeichnis	97
98. Quellenverzeichnis	98
99. Literaturverzeichnis	99
100. Quellenverzeichnis	100

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Schrifttum	3
2.1. Morphologie von Influenzaviren	3
2.2. Aufbau	3
2.2.1. RNA	3
2.2.2. Proteine	4
2.2.2.1. Hämagglutinin	4
2.2.2.2. Neuraminidase	7
2.3. Klassifizierung von Influenzaviren	8
2.4. Verhalten gegen äußere Einflüsse	10
2.5. Isolierung und Vermehrung von Influenzaviren	10
2.6. Nachweis equiner Influenzaviren	12
2.6.1. Direkter Nachweis von Virusantigen	12
2.6.2. Indirekter Nachweis von Virusantigen	12
2.6.2.1. Hämagglutinationstest (HA)	13
2.6.2.2. HämadSORption (Had)	14
2.6.2.3. Immunofluoreszenz (IF)	14
2.6.2.4. Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)	15
zum Nachweis von Virusantigen	
2.7. Nachweis von Antikörpern in Seren	16
2.7.1. Hämagglutinationshemmungstest (HAH)	16
2.7.1.1. Seruminhibitoren des Hämagglutinins	17
2.7.1.2. Reinigung von IgG durch Protein G	18
2.7.2. Komplementbindungsreaktion (KBR)	18
2.7.3. Double Immuno Diffusion (DID)	19
2.7.4. Single Radial Diffusion (SRD)	19
2.7.5. Single Radial Hemolysis (SRH)	20
2.7.6. Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)	22

3. Eigene Untersuchungen	24
3.1. Material und Methoden	24
3.1.1. Verwendete Influenzavirusstämme	24
3.1.1.1. Vermehrung der equinen Influenzavirusstämme	24
3.1.1.2. Vermehrung im bebrüteten Hühnerei	24
3.1.1.3. Vermehrung in der Zellkultur	25
3.1.2. Nachweis der Virusvermehrung	25
3.1.2.1. HämadSORption (HAD)	25
3.1.2.2. Immunofluoreszenz (IF)	26
3.1.2.3. Hämagglutinationstest (HA)	26
3.1.3. Virusreinigung	26
3.1.4. Vorbehandlung der Seren	27
3.1.4.1. Vorbehandlung mit RDE	27
3.1.4.2. Vorbehandlung mit Kaolin und Adsorption an Hühnererythrozyten	27
3.1.4.3. Vorbehandlung mit Kaliumperjodat	28
3.1.4.4. Protein-G Affinitätschromatographie	28
3.1.5. Hämagglutinationshemmungstest (HAH)	28
3.1.6. Single Radial Hemolysis (SRH)	29
3.1.7. Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) zum AntikörpERNACHWEIS	30
3.1.7.1. Absorption der Seren an Antigen unterschiedlichen Subtyps	30
3.1.7.2. Plattenbeschichtung	30
3.1.7.2.1. Aufreinigung des Antigens mit Bromelain	31
3.1.7.2.2. Aufreinigung des Antigens mit Lubrol	31
3.1.7.3. Durchführung des ELISAs	31
3.1.7.4. Durchführung des Kompetitions-ELISAs	32
3.1.7.4.1. Biotinkonjugierung	32

3.2. Ergebnisse	33
3.2.1. Züchtung in der Zellkultur	33
3.2.2. Immunofluoreszenz	34
3.2.3. Hämagglutinationshemmungstest (HAH)	34
3.2.3.1. Vergleich von HAH Titern von Seren nach Vorbehandlung mit RDE, Kaliumperjodat und Kaolin	34
3.2.3.2. Reinigung der Seren durch Protein G-Affinitätschromatographie	35
3.2.4. Single Radial Hemolysis (SRH)	38
3.2.4.1. Einfluß des HA-Titers auf die Qualität der Hämolysen	38
3.2.4.2. Einfluß des HA-Titers des verwendeten Antigens auf die Größe der Hämolysenhöfe	38
3.2.4.3. Einfluß der Inkubationszeit von SRH-Platten auf die Hämolysen	39
3.2.4.4. Erscheinungsbild der Hämolysen	39
3.2.4.5. Relation von Serumverdünnung und Größe der Hämolysen	40
3.2.4.6.1. Variation innerhalb von Platten	41
3.2.4.6.2. Variation zwischen Platten	41
3.2.4.6.3. Variation zwischen Tests	41
3.2.4.7.1. Verhalten von monoklonalen Antikörpern	41
3.2.4.7.2. Verhalten von Frettschen-Postinfektionsseren	43
3.2.4.8. Vergleich von SRH und HAH bei Pferdeseren	43
3.2.4.9. Vergleich von HAH und SRH mit unterschiedlich behandelten Seren und unterschiedlichem Antigen	50
3.2.5. Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)	54
3.2.5.1. Maßnahmen zur Vermeidung unspezifischer Bindung von Antikörpern	54
3.2.5.2. Vergleich von HAH und ELISA	56
3.2.5.3.1. Unterschiedliche Plattenbeschichtungen	56
3.2.5.3.2. Unterschiedliche Vorbehandlung der Seren	58
3.2.5.4.1. Reaktion monoklonaler Antikörper im ELISA	59
3.2.5.4.2. Kompetitions-ELISA mit monoklonalen Antikörpern	60
3.2.5.4.3. Kompetitions-ELISA mit Frettschenseren	61

4. Besprechung der Ergebnisse	62
5. Zusammenfassung	68
6. Literaturverzeichnis	70

1. Einleitung

In der heutigen Pferdepraxis spielen Erkrankungen der Atemwege eine bedeutende Rolle. Eine wesentliche Ursache dieser Erkrankungen sind equine Influenzaviren. Sie werden in einer durch Leistung und häufigen Transport belasteten Population schnell verbreitet. Durch fortlaufendes Driften der Equi 2 Stämme erfolgt eine stetige Veränderung der Antigene, der durch Kontrolle der zirkulierenden Influenzastämme und gegebenenfalls durch Anpassung der Vakzinen an diese Rechnung getragen werden muß. Bis heute ist ein 'genetischer Shift', ein Austausch von Oberflächenproteinen bei equinem Influenzavirus nicht beobachtet worden.

Die Isolierung von equinen Influenzaviren ist mit Schwierigkeiten verbunden. Influenzaviren sind außerhalb der Zelle äußerst empfindlich gegen Umwelteinflüsse und überstehen den Transport ins Labor oft nicht. Desweiteren werden Tupferproben oft zu spät entnommen, wenn die Virusausscheidung bereits beendet ist. Als Ersatz bietet sich die serologische Überwachung durch Serumtitertbestimmung an. Als älteste und am weitesten verbreitete Methode steht hier der Hämagglutinationshemmungstest, an dem sich alle neueren Verfahren messen müssen. Nachteil des HAH ist seine schlechte Reproduzierbarkeit, sowie die notwendige Vorbehandlung des Serums zur Entfernung unspezifischer Inhibitoren. Es wurde vielfach versucht, Tests zu entwickeln, die einfacher, schneller und genauer sind. Als besonders geeignet für die Untersuchung großer Zahlen von Seren ist die Radiale Gelhämolys (SRH, Single Radial Hemolysis) und der wegen seiner hohen Sensitivität in anderen Bereichen vielfach verwendete ELISA. Obwohl die SRH einige Vorteile bietet, wurde sie bisher eher vorsichtig angewendet. Gründe dafür sind Hämolysen, die durch Anti-Neuraminidase-Antikörper hervorgerufen werden, sowie Kreuzreaktionen verwandter Stämme. Der ELISA wurde inzwischen in vielen Bereichen mit Erfolg eingesetzt. Die Notwendigkeit, aus einer Vielzahl von Antikörpern, die gegen Antigene des Influenzavirions gebildet werden, die für die Infektion wichtigen zu erkennen, erschwert die Etablierung dieses sehr empfindlichen Testes in der Influenzadiagnostik.



Ziel dieser Arbeit war es, verschiedene Methoden auf ihre Verwendung in der routinemäßigen Diagnostik, wie auch in der Untersuchung einer größeren Zahl von Seren vergleichend zu überprüfen.

2. Schrifttum

2.1. Morphologie von Influenzaviren

Influenzaviren sind behüllte, pleomorphe, meist unregelmäßig kugelige Gebilde von 80 - 120 nm Durchmesser. Es existiert jedoch auch eine filamentöse Erscheinungsform, bei der die Virionen in Form langer Stränge von mehreren Mikrometern Länge vorliegen. Die Virushülle besteht aus einer Lipiddoppelmembran, die durch "budding" an der Wirtszellmembran entsteht. In ihr sind die beiden Oberflächenproteine Hämagglutinin und Neuraminidase durch eine Sequenz hydrophober Aminosäuren verankert (Wilson et al., 1981; Fields et al., 1981). Die Verteilung der Oberflächenproteine ist ungleich; in einem dichten Rasen von Hämagglutininen finden sich Gruppen zusammenstehender Neuraminidasemoleküle (Murti und Webster, 1985). Die Innenseite der Lipiddoppelmembran ist mit einer Schicht von Matrixprotein ausgekleidet. Im Innern findet sich die RNA, die mit dem Nukleoprotein und den drei Proteinen der Transkriptase (PA, PB₁, PB₂) verbunden ist (Krug, 1983).

2.2. Aufbau

2.2.1. RNA

Die einsträngige virale RNA ist in acht Segmente von 0,890 bis 2,341 KB unterteilt, mit einer Gesamtlänge von 13,588 KB. Sie liegt in negativer Leserichtung vor und bedarf deshalb der Übersetzung durch die virale Transkriptase (Air et al., 1987). Vier Segmente enthalten den genetischen Code für die Strukturproteine Hämagglutinin, Neuraminidase, Nukleoprotein und die Matrixproteine, die anderen vier Segmente codieren für die Proteine der RNA-Transkriptase PA, PB₁, PB₂ und zwei nichtstrukturelle Proteine unbekannter Funktion (Air et al., 1987). Die Transkription erfolgt durch die virale Transkriptase im Zellkern unter Beteiligung der zellulären Polymerase II, die zur Anfügung eines Primers an die mRNA benötigt wird (Krug, 1983). Die Synthese der Nukleokapsidproteine erfolgt im Zellkern, die Synthese der Hämagglutininmonomere an der Kernmembran (Bachi et al., 1985).

2.2.2. Proteine

Hämagglutinin, Neuraminidase, Nukleoprotein und Matrixprotein bilden die strukturgebenden Proteine.

Das typspezifische Matrixprotein M ist in einer Anzahl von etwa 3000 pro Virion vorhanden und kleidet die Innenseite der Virusmembran aus. Es wird zusammen mit einem als M₂ bezeichneten Protein vom siebten Segment kodiert (Lamb, 1983).

Das ebenfalls typspezifische Nukleoprotein (NP) liegt der RNA in einer Zahl von etwa 120 einzelnen Molekülen an und bildet mit ihr das Ribonukleoprotein (RNP). Matrix- und Nukleoprotein werden als innere Antigene bezeichnet. Sie werden durch Behandlung mit Detergentien freigesetzt und dienen als Antigene in der Double Immuno Diffusion (DID) und der Single Radial Immunodiffusion (SRD). Das NP ist zusammen mit drei weiteren Proteinen PA, PB₁ und PB₂ für die RNA-Replikation und -Transkription verantwortlich. Bei den Proteinen werden eine typübergreifende Immunisierung durch die Aktivierung der T-Zellgebundenen Immunität zugesprochen (Wraith et al., 1987; Wraith und Askonas, 1985). Die Funktion von zwei nichtstrukturellen Peptiden NS1 und NS2 und einem nur durch Sequenzanalyse vorausgesagten Peptides ist unklar (Lamb, 1983).

2.2.2.1. Hämagglutinin

Das Hämagglutinin besteht aus drei identischen Untereinheiten. Jede Untereinheit wird als Kette von 566 Aminosäuren synthetisiert. Nach Abspaltung einer N-terminalen Signalsequenz, die dem Transport des Proteins durch die Membran dient (Chingh-Juh et al., 1980), wird es in die beiden Untereinheiten HA1 und HA2 gespalten, die aber durch eine Disulfidbrücke verbunden bleiben. Die Spaltung erfolgt durch eine trypsinähnliche Endopeptidase bzw. durch die kombinierte Aktion einer Endo- und Ektopeptidase unter Verlust einer Aminosäure (Garten et al., 1982; Abb. 1). Durch die Spaltung erfolgt die Aktivierung des Hämagglutinins. Das Endstück des HA2 muß dazu in einer spezifischen Aminosäuresequenz vorliegen. Die Spaltung durch Chymotrypsin und ähnlicher Enzyme resultiert daher in zwar gespaltenem, jedoch inaktivem Hämagglutinin (Klenk, 1980).

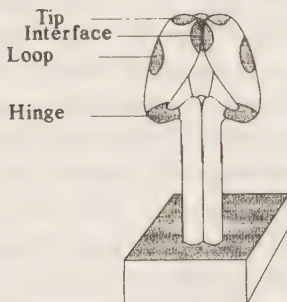
Die Verankerung des Hämagglutinins in der Lipiddoppelmembran wird durch eine hydrophobe Transmembranregion des HA2 am C-terminalen Ende gewährleistet (Abb. 2). Einige Aminosäuren distal der Transmembranregion findet sich die Spaltungsstelle für Bromelain. Durch die Spaltung mit Bromelain lassen sich wasserlösliche HA-Moleküle ohne Transmembranregion erhalten, die kristallisiert werden können (Brand und Skehel, 1972). Durch Röntgenstrukturanalyse solcher Kristalle bestimmten Wilson et al. 1981 den räumlichen Aufbau des außerhalb der Membran gelegenen Moleküls.

Die drei Untereinheiten des Hämagglutinins sind durch Wasserstoffbrücken mehrfach untereinander verbunden. Jedes Monomer besteht aus einer ca 70 Å langen stabförmigen Struktur aus drei Doppelhelices und einer distalen, globulären Region aus einem antiparallelen β -Faltblatt. Die Aminosäurekette steigt hierbei zuerst nach oben, und fällt dann wieder bis zur Membran ab, so daß das N-terminale Ende wieder in der Nähe der Membran, und zwar zur Mitte des Trimers gerichtet, zu liegen kommt (Wilson et al., 1981).

Das N-terminale Ende stellt eine hochgradig konservierte Region des Hämagglutinins dar und enthält Sequenzhomologien mit dem Fusionsprotein des Sendaivirus (Gething et al., 1978).

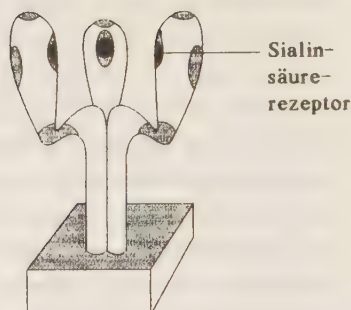
Die genetisch variablen Bereiche des Hämagglutinins lassen sich am räumlichen Modell in vier Bereiche unterteilen (Abb. 1). Die sogenannte 'Tip' Region am distalen Ende, die 'Loop' Region, einer seitlich liegenden Schleife, die 'Hinge' Region, die den proximalen stabförmigen Anteil des Moleküls mit dem distalen globulären verbindet, und die 'Interface' Region die zur Mitte des Trimers gerichtet, von den jeweils anderen Monomeren verdeckt wird (Wiley et al., 1981). Der Rezeptorbindende Bereich liegt wie die 'Interface' Region an der Innenseite des Trimeres. Bei pH 5 ändert sich die räumliche Konformation

Antigene Bereiche:



pH 7

Rezeptorbereich:



pH 5

Abbildung 1: Räumliches Modell des Hämagglutininmoleküls bei pH 7 und pH 5 mit der Lage der antigenen Bereiche und des Rezeptorbindenden Bereiches (nach: Jackson et al., 1983)

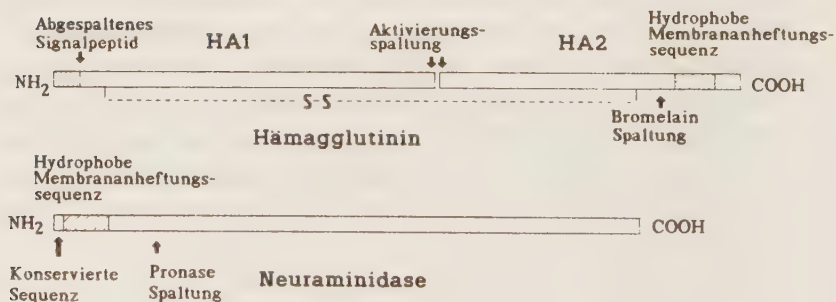


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Aminosäuresequenz von Hämagglutinin und Neuraminidase. Beide Proteine sind durch hydrophobe Sequenzen in der Membran verankert und weisen Spaltungsstellen für Proteasen auf, durch die ein großer Teil des Moleküls von der Membran getrennt werden kann. (nach: Air et al., 1987)

des HA in der Weise, daß durch Flexion des 'Hinge' Bereiches die distalen, globulären Anteile nach unten wandern und die Bindungsstellen für Sialinsäure sowie die Antigenorte des 'Interface' freigeben (Daniels, 1983; Abb.2). Dies ist der Fall, wenn das Virion bei der Infektion der Zelle durch Endozytose in intraplasmatische Vesikel aufgenommen wird.

Das Hämagglutinin enthält eine spezifische Bindungsstelle für Sialinsäure. Diese ermöglicht dem Virion die Bindung an Zellen und an bestimmte Proteine in Muzinen, wie sie in verschiedenen Körpersekreten vorhanden sind. Durch Aerosole dieser Sekrete erfolgt die Verbreitung in der Population. Die Mitbeteiligung des N-terminalen Endes an der Fusion der Virusmembran mit der Zellmembran wird vermutet. Mit Hämagglutinin besetzte Liposomen fusionierten mit Zellmembranen, wenn das Hämagglutinin in aktivierter Form vorliegt (Rott, 1980). Die Aktivierung und damit die Fusion wurden durch Zugabe von Trypsin, aber auch durch Zugabe von Neuraminidase erreicht (Huang et al., 1980 b).

Das Hämagglutinin bedeckt zu etwa 4/5 die Oberfläche des Virions (Air et al., 1987). Es ist somit das dem Wirt am stärksten präsentierte Protein. Antikörper gegen Hämagglutinin stellen den größten Anteil der gebildeten Antikörper gegen Influenzaviren dar. Ihnen werden allgemein neutralisierende Eigenschaften zugesprochen (Yamagishi et al., 1981). Veränderungen in der Struktur des Hämagglutinins ermöglichen deshalb dem Virus die antikörpergebundene, stamm-spezifische Immunität des Wirtes zu unterlaufen.

2.2.2.2. Neuraminidase

Die Neuraminidase besteht aus 4 Untereinheiten mit je sechs symmetrischen, in der Form von Propellerflügeln angeordneten β -Faltblättern. Die flachen, schachtelförmigen Gebilde der Untereinheiten enthalten ihr katalytisches Zentrum in tiefen Klüften an den äußeren Ecken der Tetramere. Der $100 \times 100 \times 60$ Å große Kopf des Moleküls wird durch einen zentralen Stiel, dessen Länge zwischen den verschiedenen Stämmen variiert, über eine hydrophobe Region in der Membran verankert (Varghese et al., 1983). Der anschließende, innermembranöse Bereich von sechs Aminosäuren Länge ist bei allen 9 Neuraminidasetypen identisch (Air et al., 1985). Pronase spaltet die Neuraminidase in eine in der Mem-

bran verbleibende Ankerregion und in ein enzymatisch noch aktives lösliches Molekül (Varghese et al., 1983).

Die Neuraminidase vermittelt die Abspaltung der Sialinsäure von Glykoproteinen. Da Sialinsäure den Rezeptor für Hämagglutinin an der Zelle darstellt, kann sich das Virion so beim Eintritt in und bei der Freisetzung aus der Zelle von der Membran lösen. Auch der Durchtritt durch muköse Flüssigkeiten wird ermöglicht und die Aggregation von neu synthetisierter HA und NA wird verhindert (Air et al., 1987). Untersuchungen von Huang (1980 a; 1980 b) lassen darüberhinaus die Beteiligung an der Fusion von Virus- und Zellmembran vermuten.

Untersuchungen mit monoklonalen Antikörpern zeigen vier antigene Bereiche an (Webster et al., 1984). Monoklonale Antikörper gegen drei dieser Bereiche vermögen die enzymatische Aktivität zu hemmen. Mit monoklonalen Antikörpern gegen zwei dieser Antigenorte gelang es, Varianten zu selektieren, welche antigene Veränderungen in diesen Bereichen zeigten (Varghese et al., 1983; Colman et al., 1983).

Antikörper gegen die Neuraminidase vermögen die Infektion des Wirtes nicht zu verhindern, jedoch wird die Schwere der Erkrankung gemildert und die Ausscheidung von Nachkommenvirus vermindert (Huang et al., 1980 a).

2.3. Klassifizierung von Influenzaviren

Influenzaviren gehören zur Familie der Orthomyxoviridae mit den Spezies Influenza A und B sowie der Spezies C, die einem eigenen Genus zugeordnet wird (Anonym, 1980). Die Einteilung in Spezies erfolgt mit Hilfe des Double Immuno Diffusion-Testes (DID) durch Unterschiede in den Matrix- und Nukleoproteinen. Innerhalb der Spezies (oder Typen) werden die Subtypen unterschieden. Die Einteilung in diese Subtypen erfolgt nach der Zusammensetzung der Hüllproteine Hämagglutinin und Neuraminidase. Die 13 Hämagglutinine und neun Neuraminidasen die bis zum jetzigen Zeitpunkt gefunden wurden, zeigen untereinander im HAH- bzw. NI-Test keine Kreuzreaktionen.

Innerhalb der verschiedenen Subtypen werden die Stämme unterschieden. Sie

zeigen mehr oder weniger starke Kreuzreaktionen in der HAH/NI und lassen sich dadurch in nah verwandte und weniger verwandte Stämme einteilen. Die Benennung der Stämme erfolgt nach den Richtlinien der WHO und beschreibt Virusspezies, Tierart bzw. Fundort, Ort der Erstisolierung, Nummer des Stammes und das Jahr der Isolierung (Anonym, 1980). In Klammern wird die Zusammensetzung der beiden Oberflächenproteine angegeben. Die im Tierreich natürlicherweise bei Pferd, Schwein, Geflügel und vereinzelt bei anderen Tierarten vorkommenden Influenzastämme werden alle der Spezies A zugeordnet. Beim Pferd wurde die historische Einteilung in die beiden Subtypen A/Equi 1 und A/Equi 2 beibehalten.

Zur Einordnung neu entdeckter Isolate wurde durch die WHO für jeden Subtyp mindestens ein Referenzstamm benannt. Für die equinen Influenzastämme sind dies bei Subtyp 1 der Stamm A/Equi/Prague/1/56(H7N7) und für Subtyp 2 die Stämme A/Equi/Miami/1/63(H3N8) sowie seit 1982 A/Equi/Fontainebleau/1/81(H3N8). Subtyp 1 ist genetisch stabil und Neuisolat unterscheiden sich serologisch kaum vom Erstisolat (Tumova et al., 1980). Subtyp 2 ist der genetischen Drift stärker unterworfen als Subtyp 1.

Grundlage serologischer Unterschiede sind Veränderungen in der räumlichen Struktur der antigenen Bereiche. Während die inneren Proteine Nukleoprotein und Matrixprotein genetisch relativ stabil sind, unterliegen die Hüllproteine einer stetigen Veränderung der Antigenorte. Die Gene für die Oberflächenproteine zeigen kleine stabile Regionen und große genetisch variable Regionen (Scholtissek, 1977). Punktmutationen im Bereich dieser variablen Region führen zum Austausch einzelner Aminosäuren und abhängig von der Seitenkette der Aminosäure eventuell zur räumlichen Umgestaltung des Antigenortes. Veränderungen an Epitopen durch Austausch bereits einer Aminosäure können mit monoklonalen Antikörpern nachgewiesen werden (Robertson et al., 1987). Unterschiedliche serologische Verhalten im HAH/NI-Test ergeben sich jedoch erst, wenn die Veränderungen die reaktiven Regionen der Proteine d.h. den Sialinsäurerezeptor des Hämagglutinins bzw. das katalytische Zentrum der Neuraminidase beeinflussen (Air et al., 1987).

2.4. Verhalten gegen äußere Einflüsse

Influenzaviren werden bei höheren Temperaturen schnell inaktiviert. Horsfall (1955) ermittelte eine mittlere Überlebensdauer in Allantoisflüssigkeit bei 35°C von 85 min, während die Hämagglutinationsreaktion noch 12 Stunden erhalten blieb. In eingetrocknetem Zustand überlebt es im Dunkeln mehrere Wochen (Edward, 1941). Influenzavirus ist in einem pH-Bereich von 5 - 10 stabil, es wird von Detergentien und den üblichen Desinfektionsmitteln schnell inaktiviert. Die Überlebensrate in der Luft ist stark von der Luftfeuchte abhängig. Während es bei 80 % rel. Luftfeuchte nach 30 min inaktiviert wird, bleibt es bei unter 25 % Luftfeuchte etwa 24 Stunden infektiös (Loosli et al., 1943). Ultraviolette Strahlung inaktiviert Virus in Aerosol innerhalb von Sekunden (Edward et al., 1943).

2.5. Isolierung und Vermehrung von Influenzaviren

Die Isolierung von Influenzaviren gelang zuerst im Frettchen, das außerordentlich empfindlich für Influenzainfektionen ist (Smith et al., 1933). Postinfektionseren von Frettchen werden deshalb oft als Referenzseren bei serologischen Nachweisen eingesetzt. Auch im Hamster (Friedewald et al., 1948), der Ratte und der Maus, wo nach einigen Blindpassagen schwere Affektionen der Lunge auftreten (Francis et al., 1937), gelang die Isolierung, Vermehrung und Passagierung von Influenzavirus.

Zur Vermehrung wird heute jedoch als Standardwirtssystem das bebrütete Hühner-ei herangezogen. Es wurde versucht Virus im Embryo selbst, im Dottersack, dem Amnion oder in den Membranen der Allantoishöhle zu vermehren. Als vorteilhaft hat sich die Injektion von Virusmaterial in die Allantois- oder die Amnionhöhle von zehn Tage alten Hühnerembryonen erwiesen und die Allantois- oder Amnionflüssigkeit nach drei Tagen zu gewinnen (Mayr et al., 1974). Die Allantoisflüssigkeit enthält jedoch einen weitaus geringeren Anteil an Mukopolysacchariden, Proteinen und anderen störenden Substanzen als Amnionflüssigkeit oder Dotter.

Die Adaptierung an die Zellkultur war anfangs unbefriedigend. Die meisten Zelllinien eigneten sich nur für die Vermehrung einzelner Virusstämme, die

dazu oft nur ungenügende Vermehrung zeigten (Tobita et al., 1975). Brion et al. (1966) gelang die Adaptierung des Stammes A/Equi/Alfort/65(H7N7) an Hühnerembryofibroblasten nur mit Verlust der Hämagglutinationsfähigkeit. Teufel (1968) konnte zwar A/Equi/Miami/1/63(H3N8) ebenfalls auf Hühnerembryofibroblasten über mehrere Passagen bis zu einem HA-Titer von 1:256 vermehren, jedoch gelang eine Vermehrung von A/Equi/Prague/1/56(H7N7) nicht. Eine größere Zahl von Stämmen, darunter auch Stämme der Spezies B ließ sich auf MDCK Zellen vermehren, nachdem man erkannte, daß proteolytische Enzyme wie sie im Hühnerei von Natur aus vorhanden sind, die Infektiosität verstärken, bzw. erst ermöglichen (Tobita, 1975; Tobita et al., 1975). Came et al. (1968) setzte dem Erhaltungsmedium der Zellen Pankreatin zu, Appleyard und Maber (1974) verwendeten Trypsin. Inzwischen ist bekannt, daß erst die proteolytische Spaltung des Hämagglutinins durch Trypsin, Acrosin und ähnliche Proteasen die Aktivierung des Moleküls bewirken (Rott, 1980). Trotzdem ergeben sich von Stamm zu Stamm große Unterschiede, vor allem im Plaque-Test (Tobita et al., 1975). Bewährt hat sich die Zelllinie MDCK, die von Gaush und Smith (1964) erstmals im Plaque-Test verwendet wurde. Yamagishi et al. (1981) beschreiben die Vermehrung equiner Stämme beider Subtypen in Vero- und MDCK-Zellen und ihre Verwendung im Neutralisationstest. Dabei gelingt die Vermehrung jedoch auch in Zellkultur ohne die Zugabe von Proteasen. Weitere Berichte über die Vermehrung equiner Influenzaviren ohne die Zugabe von Proteasen liegen jedoch nicht vor.

Influenzaviren die in der Zellkultur isoliert wurden, vermehren sich im bebrüteten Hühnerei zuerst schlecht. Grund dafür ist eine wirtsspezifische Glykosylierungsstelle des Hämagglutinins, die bei Adaptation an das Ei verlorengeht (Robertson et al., 1987). Es wird vermutet, daß diese Stelle mit dem Rezeptor der Zellen der Allantoismembran interagiert und die Vermehrung erst dann verstärkt erfolgen kann, wenn sich Varianten ohne diese Anheftungsstelle für Karbohydrat selektiert haben (Air et al., 1987).

Identische Feldstämme, die in Hühnerembryonen bzw. in Säugetierzellkulturen isoliert wurden, lassen sich mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern unterscheiden (Schild et al., 1983). In der Aminosäuresequenz des HA zeigen sie Abweichungen von mindestens einer Aminosäure, die zum Teil serologisch nachweisbar sind. Wird Virus aus Hühnerembryonen anschließend auf Zellkultur

vermehrt, so wird auch nach mehreren Passagen keine Mutation beobachtet (Robertson et al., 1985).

2.6. Nachweis equiner Influenzaviren

2.6.1. Direkter Nachweis von Virusantigen

Ein direkter Nachweis von Influenzaviren in Sekreten bzw. darin enthaltenen Zellen kann mit Hilfe der Immunofluoreszenz und des ELISAs durchgeführt werden (Tateno et al., 1966; Cook et al., 1988). Der Nachweis durch Immunofluoreszenz ist jedoch durch die geringe Menge an Antigen im Untersuchungsmaterial erschwert und zeigt eine geringere Sensitivität als die Isolierung und anschließende Charakterisierung mit Hilfe der HAH (Fulton und Middleton, 1974).

Harmon et al. (1982) beschreiben die Verwendung eines ELISA in der Sandwichmethode zum Nachweis humaner Influenzaviren in Tupferproben. Der Nachweis gelingt allerdings nur in 53% der nach Virusisolierung positiv gefundenen Proben.

Cook et al. (1988) wiesen RNP-Antigen in Tupferproben von Pferden nach, die mit A/Equi/Newmarket (H3N8) infiziert wurden. Der Test erfolgt als Sandwichelisa mit einem polyklonalen Antiserum als Plattenbeschichtung. Als Nachweissystem dienen ein monoklonaler Antikörper und mit Peroxidase markierte Anti-Maus-IgG-Antikörper. Die Sensitivität des Testes war weitaus höher als die Virusisolierung im Hühnerei mit anschließender HAH. Bei einigen Pferden konnte eine Virusvermehrung nur im ELISA festgestellt werden. Pferde die in beiden Tests positiv waren und solche die nur im ELISA positiv waren, zeigten anschließend im Serum HAH-Titer gegen das entsprechende Antigen. Weitere Untersuchungen über den direkten Nachweis equiner Influenzaviren sind nicht bekannt.

2.6.2. Indirekter Nachweis von Virusantigen

Die Isolierung von Influenzaviren kann im bebrüteten Hühnerei und in der Zellkultur erfolgen. Dazu werden Tupferproben in ein geeignetes Transportmedium verbracht und mit Antibiotika versetzt. Die Infektion des Hühnereis erfolgt

durch Injektion des Probenmaterials in die Allantois- oder Amnionhöhle von 10 Tage bebrüteten Hühnerembryonen. Nach Inkubation der Eier für drei Tage kann die virushaltige Allantois- oder Amnionflüssigkeit gewonnen werden. Anschließend wird die Viruskonzentration durch im Hämagglutinationstest bestimmt. Bei fehlendem oder geringem Hämagglutinationsvermögen kann eine zweite und dritte Passage im Ei erfolgen.

Für die Isolierung in der Zellkultur werden im Allgemeinen permanente Zelllinien in serumfreiem Erhaltungsmedium verwendet. Dem Medium wird normalerweise Trypsin zugesetzt (Anonym, 1982). Die Vermehrung von Virus wird durch das Auftreten eines zytopathogenen Effektes angezeigt. Wird in den ersten Passagen kein cpE ausgebildet, so kann durch die Hämadsorption oder die Hämagglutination die Bildung von Virus nachgewiesen werden.

Eine direkte Einordnung des isolierten Antigens kann mit diesen Methoden jedoch nicht erfolgen; hier sind zusätzliche serologische Verfahren notwendig.

Zur Einordnung in Subtypen werden Hämagglutinin und Neuraminidase bestimmt.

Zur Bestimmung des Hämagglutinins werden der Hämagglutinationshemmungstest (HAH), die Radiale Gelhämolysen (Single Radial Hemolysis = SRH) und die Einfache Immunodiffusion (Single Radial Immunodiffusion = SRD) durchgeführt (Palmer et al., 1975; Schild et al., 1975; Schild et al., 1972). Die Verwendung eines ELISAs wird von Denyer und Crowther (1986) beschrieben.

Die Bestimmung der Neuraminidase erfolgt durch den Neuraminidasehemmungstest (NI) und den Lektintest (Van Deusen et al., 1983; Luther et al., 1980).

Die Einordnung von Stämmen, die in Zellkultur isoliert wurden kann zusätzlich durch die Immunfluoreszenz erfolgen. Hier kann durch die Verwendung spezifischer polyklonaler Seren und monoklonaler Antikörper eine Bestimmung unterschiedlicher Spezifität erreicht werden (Johansson et al., 1979; Schmidt et al., 1982; Döller et al., 1987).

2.6.2.1. Hämagglutinationstest (HA)

Die hämagglutinierende Wirkung von Influenzavirus und ihre Hemmung durch Antiseren wurde erstmals 1941 von Hirst beschrieben. Nach Barrett und Inglis (1982) entspricht eine Hämagglutinierende Einheit ungefähr 2×10^6 EID (egg infectious doses) oder 10^7 elektronenoptisch nachweisbaren Partikeln. Die HA gibt jedoch keine direkte Auskunft über die Infektiosität. Bekannt ist die Bildung

von Defective Interfering Particles (DIP) nach Infektion der Zelle mit hohen Viruskonzentrationen, die ein PB₂ ähnliches Protein enthalten, das durch Komplexbildung mit RNP die Neubildung infektiöser Virionen verhindert (Akkina und Nayak, 1987). Der Hämagglutinationstest wird heute allgemein mit Hühner- oder Meerschweinchenerythrozyten in einer Konzentration von 0,5% auf Mikrotiterundbodenplatten bei Raumtemperatur durchgeführt (Anonym, 1982).

2.6.2.2. Hämadsorption (Had)

Die Hämadsorption weist Hämagglutinine nach, die in der Membran der infizierten Zelle vorhanden sind. Sie ist deshalb nicht an das Auftreten von kompletten Virionen im Zellkulturüberstand gebunden. Der Nachweis ist auch bei Erstisolaten möglich, die noch keine oder nur geringe Hämagglutination zeigen. Die Hämadsorption wird bereits vor dem Auftreten eines cpE positiv und erlaubt so den raschen Nachweis einer Virusvermehrung. Durch Zählung der mit Erythrozyten besetzten Bereiche kann eine quantitative Bestimmung des vermehrten Antigens durchgeführt werden (Hotchin et al., 1960). Die Hämadsorption wird zum Nachweis von Influenzaviren im allgemeinen mit Hühner- oder mit den als empfindlicher beschriebenen Meerschweinchenerythrozyten durchgeführt (Anonym, 1982).

2.6.2.3. Immunofluoreszenz (IF)

Der Nachweis von Influenzaviren mit Hilfe der Immunofluoreszenz wurde bisher nur für humane Influenzastämme beschrieben.

Er erfolgt meist als indirekter Nachweis nach Anzüchtung der Erreger in Zellkultur (Johansson et al., 1979; Döller et al., 1987). Nach Auftreten eines cpE bzw. einer positiven Hämadsorptionsreaktion werden die Zellen fixiert. Als Reaktionspartner finden Hyperimmunseren, monoklonale Antikörper oder Antikörper aus Eidotter immunisierter Hennen Verwendung.

Döller et al. (1987) beschreiben die subtypspezifische Identifizierung von Influenzavirus aus Tupferproben nach Isolierung in MDCK Zellen. Die Typisierung erfolgt mit fluoreszeinkonjugierten Antikörpern aus Eidotter immunisierter Hennen. Zur Erzielung der Subtypspezifität werden diese vorher an RNP Antigen absorbiert (Döller et al., 1987).

Schmidt et al. (1982) beschreiben die Verwendung verschiedener monoklonaler Antikörper bei der Bestimmung von Virusstämmen nach Isolierung in CMKC (Cynomologus Monkey Kidney) Zellen. Die MAKs zeigen unterschiedliches Bindungsverhalten, das nicht mit den Ergebnissen der HAH übereinstimmt. Während einige Klone nur an eng verwandte Stämme binden, zeigen andere subtyp- und typspezifisches Verhalten. Es muß deshalb zur Charakterisierung eines unbekannten Isolates immer ein ganzes Panel von monoklonalen Antikörpern eingesetzt werden, um auch stark gedriftete Isolate zu erkennen. Johansson et al. (1979) charakterisieren die in MDCK isolierten Influenzaviren mit Hilfe eines subtypspezifischen Hyperimmunserums. Zur Erlangung der Subtypspezifität wird dieses an heterologes Antigen absorbiert.

2.6.2.4. Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) zum Nachweis von Virusantigenen

Denyer und Crowther entwickelten 1986 einen ELISA zum Vergleich von Virusisolaten mit Postvaccinationsseren von Pferden und mit Frettchenseren. Zuerst erfolgte die Bestimmung einer Serumkonzentration, die im ELISA gegen die mit Antigen beschichtete Platte 70% der maximalen OD₄₉₂ erreichte. Diese Konzentration wurde während des eigentlichen Testes verwendet. Im zweiten Teil des Testes wurden Verdünnungsreihen eines Virusisolates in Mikrotiterplatten angelegt und davon je 25µl auf bereits mit einem homologen Virus beschichtete ELISA-Platten überführt. Nach Zugabe von homologem Serum konnte so die Hemmung der Bindung von Serumantikörpern an das in der festen Phase gebundene Antigen durch homologes Virus in der flüssigen Phase bestimmt werden. Nach Austausch des Antigens sowohl der festen wie der flüssigen Phase wurde der Prozentsatz an Hemmung bestimmt, den ein heterologes Virus gegenüber dem homologen Stamm erreichte. Die Differenz zwischen homologer und heterologer Hemmung wurde als Maß für die Abweichung zweier Stämme herangezogen. Der Vergleich von vier Stämmen des Subtypes 1 und von 5 Stämmen des Subtypes 2 zeigte klare Unterschiede zwischen geographisch und zeitlich entfernt gefundenen Isolaten. Isolate des gleichen Ausbruches unterschieden sich nicht. Die verwandtschaftlichen Beziehungen innerhalb der H3N8-Stämme, die Hinshaw et al. (1983) in der HAH mit monoklonalen Antikörpern gezeigt hatten, konnten mit diesem Verfahren nur bedingt nachvollzogen werden. Die

Unterscheidung von Stämmen anderer Subtypen konnte eindeutig getroffen werden.

2.7. Nachweis von Antikörpern in Seren

Der Nachweis von Antikörpern gegen Influenzaviren in Pferdeseren dient zum einen der Erkennung des Immunstatus eines Pferdes oder einer Population. Dabei kann die Menge der gebildeten Antikörper festgestellt werden. Einige Nachweisverfahren erlauben darüberhinaus eine Aussage über die Spezifität der Antikörper gegen bestimmte Subtypen oder Stämme und gegen bestimmte Strukturen der Antigene. Zum anderen kann mit Hilfe der serologischen Untersuchung das Zirkulieren bestimmter Stämme in einer Population verfolgt werden. Der Antikörpernachweis in Serumpaaren dient zusätzlich der Feststellung einer stattgefundenen Infektion durch bestimmte Influenzavirusstämme.

2.7.1. Hämagglutinationshemmungstest (HAH)

Die Hemmung der Hämagglutination wird durch die Bindung eines Antikörpers an den Rezeptorbindenden Bereich des Hämagglutinins hervorgerufen. Auch eine Bindung an Bereiche des Hämagglutinins, die eine Konformationsänderung des Moleküls verhindern, hemmen die Hämagglutination. Die Bindung an andere Bereiche des Hämagglutinins muß dagegen keine Hemmung nach sich ziehen (Jackson et al., 1983). Nach Webster et al. (1982) können auch Antikörper, die gegen Neuraminidase gerichtet sind, die Hämagglutination hemmen, wenn sie durch die Bindung an Neuraminidase in die unmittelbare räumliche Nähe der Hämagglutinine gelangen.

Die Epitope des Hämagglutinins verteilen sich auf vier räumlich getrennte Bereiche (Wiley et al., 1981). Da diese vier Bereiche zu den genetisch variablen Regionen zählen, äußert sich eine Veränderung der Aminosäuresequenz schnell in einer verminderten Sensibilität gegenüber hämagglutinationshemmenden Antikörpern. Die HAH hat somit den Nachweisen einer reinen Antigen-Antikörper-Bindung gegenüber den Vorteil, die tatsächlich erfolgte Hemmung der Bindungsfähigkeit des Antigens anzuzeigen. Sie wird durch Antikörper, die gegen andere Strukturen des Virions gerichtet sind, nicht beeinflusst.

Verschiedentlich wurde gezeigt, daß hämagglutinationshemmende Antikörper eng mit der Virusneutralisation verbunden sind (Yamagishi et al., 1981). Die HAH gibt somit direkt Auskunft über den Immunstatus eines Individuums. Weitere Vorteile sind die hohe Sensitivität, sodaß bereits geringe Abweichungen zwischen den Hämagglutininen verschiedener Stämme erfaßt werden, die geringe Menge an benötigtem Antigen und die wenig aufwendige Technik. Als Nachteil wird die Notwendigkeit der Vorbehandlung der Seren angesehen (Schild et al., 1975). Auch wird die Reproduzierbarkeit gering eingeschätzt. Titerunterschiede bis 400% werden deshalb als nicht signifikant betrachtet (Aymard, 1977; Russell et al., 1975). Der Hämagglutinationshemmtest wird wie der HA-Test auf Mikrotiterplatten durchgeführt. Als Antigen wird meist Virus aus Allantoisflüssigkeit verwendet, das durch die Behandlung mit Tween/Äther inaktiviert wurde (John und Fulginiti, 1966).

2.7.1.1. Seruminhibitoren des Hämagglutinins

Unbehandelte Seren weisen unspezifische hämagglutinationshemmende Aktivitäten auf, die auf die Wirkung von verschiedenen Inhibitoren zurückzuführen sind.

Als α - oder Francis-Inhibitor wird ein in Muzinen und verschiedenen Körpergeweben und -flüssigkeiten vorhandener Inhibitor bezeichnet (Francis, 1947). Seine Wirkung beruht auf der kompetitiven Hemmung des Hämagglutinins. Er ist hitzestabil, kann jedoch durch RDE (Receptor Destroying Enzyme) oder Kaliumperjodat zerstört werden. Francis-Inhibitoren können zudem die Infektösität des Antigens neutralisieren.

Als β - oder Chu-Inhibitor wird ein Glykoprotein bezeichnet, daß keine Sialinsäure enthält. Es neutralisiert das Virus, kann jedoch durch Erhitzen auf 56°C für 30 min bzw. durch Proteasen inaktiviert werden und läßt sich an Kaolin adsorbieren (Chu, 1951).

Zur Inaktivierung von Inhibitoren wurden verschiedene Methoden entwickelt, die im folgenden kurz geschildert werden.

Burnett und Stone beschrieben 1947 das 'Receptor Destroying Enzyme' (RDE) aus einem Filtrat von *Vibrio cholerae*, welches die Rezeptoren für Influenzavirus auf Erythrozyten zerstört. Der Mechanismus der Inaktivierung besteht auf der Abspaltung von N-acetyl-Neuraminsäure von Glykoproteinen

(Gottschalk, 1958). Für die Behandlung von Seren werden neben dem hochgereinigtem Enzym auch grobe Filtrate eingesetzt, die noch eine Reihe anderer Enzyme wie Trypsin enthalten. Die Seren werden allgemein über Nacht bei 37°C inkubiert und die Enzymaktivität am nächsten Tag durch Erhitzen auf 56°C für 30 min inaktiviert (Anonym, 1982).

Eine schnelle und unkomplizierte Methode zur Entfernung unspezifischer Inhibitoren beschreibt Hirst (1949). Die Seren werden in PBS und Kaliumperjodat verdünnt und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert.

Die Inaktivierung von Inhibitoren durch Kaolin (Bolus alba) erfolgt durch die Inkubation der Seren in 20 %igem Kaolin in PBS. Anschließend müssen die Seren noch an Hühnererythrozyten adsorbiert werden, um Isoagglutinine zu entfernen. (Mayr et al, 1974)

Weitere in der Literatur beschriebene Verfahren sind die Inaktivierung durch Trypsin (Sampaio und Isaacs, 1953) oder die Inkubation in gesättigtem CO₂ (Stakhanova, 1958), die aber keine weitere Verbreitung gefunden haben.

2.7.1.2. Reinigung von IgG durch Protein G

Protein G ist ein rekombinantes Streptokokken-Protein, dessen albuminbindende Komponente durch gentechnische Maßnahmen entfernt wurde. Es bindet spezifisch an den Fc-Rezeptoren von IgG im pH-Bereich von 6-9. Im Gegensatz zu Protein A, das nur die Antikörper bestimmter Spezies zu binden vermag, hat Protein G ein weitaus größeres Bindungsspektrum, das auch Pferdeantikörper umfaßt (Guss et al., 1987). Durch Kopplung an Sepharose kann Protein G in der Affinitätschromatographie verwendet werden, um aus Serum spezifisch Antikörper der IgG Klasse zu reinigen (Nilson et al., 1987). Eine Verwendung von Protein G zur Reinigung von Immunglobulin G des Pferdes zur Untersuchung von Serum-inhibitoren wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben.

2.7.2. Komplementbindungsreaktion (KBR)

Die Komplementbindungsreaktion beruht auf dem Verbrauch von Komplement bei der Antigen-Antikörperbindung. Der Komplementverbrauch wird durch Zugabe eines hämolytischen Systems zu dem zu testenden Antigen-Antikörper-

gemisch sichtbar gemacht. Dieses hämolytische System besteht im Allgemeinen aus Schaferythrozyten und einem hämolytischen Ambozeptor (Mayr et al., 1974). Komplementbindende Antikörper können häufig früher als hämagglutinationshemmende oder neutralisierende Antikörper nachgewiesen werden. Daher wurde die KBR auch zum Nachweis frischer Infektionen benützt. Nachteilig an diesem Verfahren sind jedoch der große Aufwand sowie die geringe Sensitivität (Garin et al., 1986).

2.7.3. Double Immuno Diffusion (DID)

Der Nachweis der Antigen-Antikörperbindung erfolgt durch die sichtbare Präzipitation der beiden Reaktionspartner nach Diffusion in Agarosegel. Das Antigen muß hierbei als "lösliches" Antigen ("Soluble" oder S-Antigen = RNP) vorliegen, da komplette Virionen zu groß sind, um diffundieren zu können. Wird Virus verwendet, das durch Detergentien gespalten wurde, werden mehrere Präzipitationslinien sichtbar. Für den Nachweis werden große Mengen an Antigen benötigt und die Sensitivität ist gering. Auch kann bei Verwendung von RNP nur der Typ des Antigens bestimmt werden.

2.7.4. Single Radial Diffusion (SRD)

Die Möglichkeit, komplettes Virus als Antigen zu verwenden und damit spezifisch und quantitativ HAH und NI-Antikörper nachzuweisen, ist der Vorteil der SRD. Im Gegensatz zur DID liegt hier das Antigen stationär in Agarosegel verteilt vor, während die Antikörper aus Stanzlöchern in die Agarose diffundieren. Der Nachweis der Antigen-Antikörperbindung erfolgt nicht durch Präzipitation, sondern durch die Änderung des Lichtbrechungsindex im Gel. Infolge der Bindung werden opalisierende, kreisförmige Flächen sichtbar (Schild et al., 1972). Die Flächen von Anti-HA-Antikörpern werden als scharf umgrenzt und deutlich beschrieben, während Anti-NA-Antikörper Flächen undeutlicher, unscharf begrenzter Opaleszenz bilden. Schild et al. (1973) führt dies auf die geringere Menge von Neuraminidasemolekülen auf der Oberfläche des Virions zurück. Durch Verwendung von aufgespaltenem Antigen können auch RNP und

Matrixproteine nachgewiesen werden.

Die SRD wird nicht, wie die HAH durch Inhibitoren gestört, sie ist einfacher durchzuführen als der NI Test. Zudem erlaubt sie die quantitative Erfassung von Antikörpern gegen HA, NA, RNP und Matrixprotein (Schild et al., 1972). Ihr Nachteil ist der Bedarf an großen Mengen hochgereinigten Antigens (Russell et al., 1975).

2.7.5. Single Radial Hemolysis (SRH)

Die SRH wurde 1975 von Schild et al. als Modifikation der SRD entwickelt. Ihre Anwendung erstreckt sich auf den Nachweis von Antikörpern gegen Hämagglutinin und gegen die Neuraminidase. Über ihre Verwendung zum Nachweis von Antikörpern gegen Influenzavirus B wird ebenfalls berichtet (Goodeve et al., 1983). Der Antikörpernachweis beruht auf der Hämolyse von Schaferythrozyten bei Kontakt mit Antikörpern unter der Anwesenheit von Antigen und Komplement. Die Erythrozyten werden hierzu durch Inkubation mit Antigen in der Kälte sensibilisiert. Die sensibilisierten Erythrozyten werden zusammen mit Komplement in ein Agarosegel gegossen, in das die Antikörper aus Stanzlöchern diffundieren (Schild et al., 1975). Die Empfindlichkeit des Testes kann durch Zugabe von Chromchlorid oder Kaliumperjodat zu den Erythrozyten gesteigert werden (Anonym, 1982; Russell et al., 1975). Eine weitere Steigerung, etwa zum Nachweis von Neuraminidase, wird durch Behandlung der Erythrozyten mit Butanol erreicht (Gibson et al., 1985).

Die Vorbehandlung der zu testenden Seren beschränkt sich auf die Inaktivierung durch Erhitzen.

Die Größe der Hämolyseflächen ist abhängig von der Konzentration an Erythrozyten und der Menge an Antigen, die zur Sensibilisierung verwendet wird. Abnehmende Erythrozytenkonzentration vergrößert die Fläche, wobei die Hämolyse unklarer wird und die Grenze der Flächen verwischt (Schild et al., 1975). Zunehmende Antigenmengen verkleinern die Hämolyseflächen. Russell et al. (1975) fanden bei Verdoppelung der eingesetzten HE eine Abnahme der Fläche um maximal 50 %. Die Erythrozyten können jedoch nur eine bestimmte Menge an Antigen binden. Ist die Sättigung erreicht, erfolgt keine weitere Verkleinerung der Hämolysefläche mehr.

Unspezifische Inhibitoren der HAH erzeugen keine Hämolysen in der SRH und müssen deshalb nicht berücksichtigt werden (Schild et al., 1975). In einigen Fällen wurden jedoch auf virusfreien Kontrollplatten Hämolysen gefunden, die durch bakterielle Hämolsine oder durch Antikörper, die gegen Hühnererythrozyten (Forssmann-Antigen) gerichtet sind, hervorgerufen werden. Aus diesem Grund müssen alle Seren vor dem Test auf einer Kontrollplatte getestet und im positiven Falle an Hühnererythrozyten adsorbiert werden (Schild et al., 1975).

Viele Autoren berichten von partiellen Hämolysen (Mentel et al., 1978; Aymard, 1977; Schild et al., 1975). Hierbei wird nur ein Teil der Erythrozyten hämolysiert. Die Grenzen der Hämolyse sind meist unscharf, wodurch die genaue Bestimmung der Durchmesser erschwert wird. Desweiteren wird das Phänomen der Doppelzonenbildung beschrieben: das gleiche Serum erzeugt eine kleinere, klare Hämolyse und eine größere, partielle Hämolyse (Anonym, 1982).

Für das Erscheinen partieller Hämolysen werden zwei Faktoren verantwortlich gemacht. Schild et al. (1975) können in Platten mit hohem Antigentiter partielle Hämolysen durch Anti-Neuraminidasesen erzeugen. Mentel et al. (1978) und Schild et al. (1975) finden partielle Hämolysen die durch Antikörper gegen verwandte Stämme hervorgerufen werden. Die Unvollständigkeit der Hämolyse ließe sich in diesem Falle durch die geringere Affinität der kreuzreagierenden Antikörper gegenüber den homologen Antikörpern erklären.

Die Bindung von Antikörpern in der SRH ist wie in der HAH nicht auf das Antigen des homologen Stammes beschränkt. Schild et al. (1975) fanden diese Kreuzreaktionen in der SRH jedoch schwächer ausgeprägt als in der HAH; Russell et al. (1975) beobachteten Kreuzreaktionen nur zwischen eng verwandten Stämmen.

Die Ausbreitung des Serums im Gel erfolgt nach den Gesetzen der Diffusion und in Form einer Sättigungskurve. Die Fläche der Hämolyse entspricht direkt der Menge an reagierenden Antikörpern. Viele Autoren fanden eine lineare Beziehung von verschiedenen Verdünnungen von Seren und den gemessenen Durchmessern (Schild et al., 1975), zwischen dem $\log_2$ der Serumverdünnung und der Fläche (Russell et al., 1975) bzw. dem $\log_{10}$ der Serumverdünnung und dem Durchmesser der Hämolysen (Plateau und Cruciere, 1983).

Bei wiederholten Tests mit gleichen Seren wurde für die SRH eine höhere Genauigkeit gefunden, als für die HAH. Die Standardabweichung der Durchmesser gleicher Seren wird innerhalb einer Platte mit 0,5-3,5% (Plateau und Cruciere, 1983), 1,36-1,59% (Russell et al., 1975), 0,7-8,9% (Smith et al., 1987) angegeben. Signifikante Abweichungen wurden bei Smith et al. (1987) mit 22,2% für humane Seren berechnet, für Hamsterseren mit 15,4%, Frettchenseren 36,4% und Mäuseseren 29,1%. Schild et al. (1975) finden Unterschiede von 10% signifikant, Russell et al. (1975) von 13%. Nach Schild sind deshalb Unterschiede von Serumpaaren in der SRH, die einem Unterschied in der HAH von mehr als 50% entsprechen, signifikant für stattgefundene Seroconversion. Dies ist eine wesentlich höhere Genauigkeit als für den HAH-Test angegeben, hier werden erst Titerunterschiede von mehr als 400% als signifikant erachtet (Schild et al., 1975).

2.7.6. Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) zum Nachweis von Antikörpern in Seren

ELISAs wurden zum Nachweis von Antikörpern gegen Influenzaviren in Humanseren mehrfach eingesetzt (Bishai et al., 1978; Murphy et al., 1980; Julkunen et al., 1984). Zum Nachweis von Antikörpern in equinen Seren wurde ein ELISA von Denyer et al. (1984) und Garin et al. (1986) entwickelt. Die Verwendung dieser Technik wird jedoch durch das Auftreten unspezifisch bindender Antikörper sehr erschwert. Denyer et al. (1984) berechnen den Anteil von Antikörpern, die gegen unspezifische Strukturen binden, auf 30%. Unspezifische Antikörper können gegen eine Vielzahl von Strukturen gerichtet sein: gegen die Kunststoffe der verwendeten Platten, gegen die in Vakzinen enthaltene Allantoisproteine und gegen typ- und subtypspezifische Strukturen der Influenzaviren, die auch bei Verwendung von komplettem Virus durch den Beschichtungsprozeß freigesetzt werden (Tijssen, 1986).

Es wurden verschiedenen Verfahren entwickelt um möglichst spezifische Nachweise zu erhalten. Denyer et al. (1984) beschreiben die Absorption von Seren an das irrelevante Antigen A/Porcine/Shope/1/33(H1N1). Die Absorption der kreuzreagierenden Antikörper erfolgt durch Zugabe des Antigens zu dem bereits in der Verdünnungsreihe vorliegenden Serum mit nachfolgender Inkubation bei 4°C über Nacht. Der Vergleich der im ELISA gemessenen optischen Dich-

ten von unbehandelten und von absorbierten Seren zeigt eine deutliche Reduktion der Bindung unspezifischer Antikörper durch die Absorption. Die Ergebnisse des ELISAs zeigen hohe Subtypspezifität und eine hohe Korrelation mit den Titern der HAH.

Garin et al. (1986) vergleichen die durch ELISA und Komplementbindungsreaktion gemessenen Antikörpertiter von Pferden nach der Infektion mit Influenzaviren. Die Bindung von Antikörpern an die mit komplettem Antigen beschichtete Platte wird mit enzymmarkierten Anti-Pferd-IgG Antikörpern vom Kaninchen nachgewiesen. Die Untersuchung von 169 Pferdeseren, die im Rahmen der Diagnostik gesammelt worden waren, ergab eine Übereinstimmung mit der KBR bei negativen und positiven Seren in 75% der Fälle. Der Vergleich der Titer beider Tests ergab eine Korrelation von $R = 0,69$. Alle Seren waren sowohl in der KBR als auch im ELISA negativ gegen Antigene der Typen B und C. Als Ursache für die unterschiedlichen Titer von KBR und ELISA werden von Garin et al. Antikörper der Klasse IgM diskutiert, die nur in der KBR nachgewiesen werden. Ebenfalls unklar ist das Verhalten von IgG (T) die, nicht komplementbindend, einen großen Anteil der IgG beim Pferd stellen (Tizard, 1982).

3. Eigene Untersuchungen

3.1. Material und Methoden

3.1.1. Verwendete Influenzavirusstämme

Für die Untersuchungen wurden folgende Virusstämme verwendet: Als Referenzstamm des Typs Equi 1 der Stamm A/Equi/Prague/56(H7N7) und vom Typ Equi 2 der Referenzstamm A/Equi/Miami/1/63(H3N8) und die in neuerer Zeit isolierten Virusstämme A/Equi/Kentucky/1/81(H3N8), A/Equi/Fontainebleau/79(H3N8), A/Equi/Solvalla/79(H3N8), A/Equi/Switzerland/22225/79(H3N8), A/Equi/Algiers/1/72(H3N8). Alle waren durch drei bis sechs Passagen im bebrüteten Hühnerei vermehrt worden.

3.1.1.1. Vermehrung der equinen Influenzavirustämme

Um eine Rekombination verschiedener Virusstämme im Labor zu verhindern, wurden folgende Vorsichtsmaßnahmen getroffen:

Die Vermehrung der Influenzavirusstämme erfolgte in einer sterilen Werkbank. Am gleichen Arbeitsplatz wurde nur ein Stamm verwendet und der Arbeitsplatz wurde anschließend für mindestens 30 min durch UV-Bestrahlung desinfiziert, bevor mit einem anderen Stamm gearbeitet wurde.

3.1.1.2. Vermehrung im bebrüteten Hühnerei

Virus wurde durch Inokulation der Allantoishöhle von zehn Tagen bebrüteten Hühnerembryonen vermehrt (Mayr et al., 1974). Dazu wurde jedes Ei mit 0,1ml virushaltiger Allantoisflüssigkeit (1:50 in PBS verdünnt) beimpft und drei Tage bei 37°C bebrütet. Die Allantoisflüssigkeit wurde gewonnen und die HA-Titer im Hämagglutinationstest bestimmt. Allantoisflüssigkeit mit einem ausreichenden Titer wurde gepoolt und für 10 min bei 2200 x g zentrifugiert.

Der Überstand wurde bei -70°C gelagert. Zum Ausschluß einer Kontamination der Embryonen mit Newcastle-Virus (NDV) wurde die gepoolte Allantoisflüssigkeit im HAH-Test mit Anti-NDV Serum untersucht.

3.1.1.3. Vermehrung in der Zellkultur

Zur Vermehrung wurde die permanente Hundenierenzelllinie MDCK (Madin Darby Canine Kidney) der Passagen 65 - 80 benutzt. Die Zellen wurden in Anzuchtmedium (EMEM mit 10 % FKS) vermehrt und alle drei Tage im Verhältnis 1:3 geteilt. FKS wurde später durch BMS (Basal Medium Supplement; Biochrom, Heidelberg) ersetzt.

Zur Passagierung der Influenzavirusstämme wurden Röhrchenkulturen von MDCK Zellen in Anzuchtmedium angelegt. Nach dem Konfluieren wurden die Zellen zweimal mit MEM gespült. Pro Röhrchen wurden je 0,1 ml 1:100 in MEM verdünnte Allantoisflüssigkeit bzw. Zellkulturmaterial 60 min bei 37°C adsorbiert. Die Röhrchen wurden anschließend mit je 1,5 ml MEM unter Zusatz von 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Trypsin beschickt und bei 37°C inkubiert. Negativkontrollen wurden ebenso behandelt. Sobald ein vollständiger cpE auftrat, wurden die Röhrchen gefriergetaut und der Titer in der HA bestimmt. Auf diese Weise wurden mit jedem Stamm 10 Passagen durchgeführt. Dieses Material wurde dann in Rollerflaschen in der gleichen Weise vermehrt.

3.1.2. Nachweis der Virusvermehrung

3.1.2.1. Hämadsorption (Had)

Durch die Hämadsorption (Had) kann eine Virusvermehrung schon vor dem Auftreten eines cpE und der positiven Hämagglutinationsreaktion nachgewiesen werden. Dazu wurde das Medium von infizierten Kulturen und jeweils einer Negativkontrolle dekantiert und die Zellkultur einmal mit PBS gespült. Dann wurde 1 ml einer 0,5%igen Hühnerythrozytensuspension auf die Zellen gegeben und 15 min bei Raumtemperatur belassen. Nach wiederholtem Spülen der Zellkultur wurden die Zellen auf das Auftreten charakteristischer Erythrozytenanlagerungen, die bei Virusvermehrung zu beobachten waren, untersucht.

3.1.2.2. Immunofluoreszenz (IF)

Zum Nachweis der Virusvermehrung mit Hilfe der Immunofluoreszenz wurden MDCK Kulturen auf Deckplättchen in Leighton tubes angelegt und nach Konfluieren wie Röhrchenkulturen infiziert. Nach 16 h wurden die Deckplättchen und eine Negativkontrolle mit NaCl-PP gespült, in Aceton fixiert, der MAK 7/12 (Noe, 1986) in der Verdünnung 1:50 aufgetragen und für 30 min bei 37°C in der feuchten Kammer inkubiert. Nach Spülen mit NaCl-PP wurde ein FITC konjugierter Anti-Maus-IgG-Antikörper (Dakopatts, Hamburg) in einer Verdünnung von 1:30 aufgetragen und ebenfalls in der feuchten Kammer für 30 min inkubiert. Nach erneutem Spülen mit NaCl-PP wurden die fixierten Zellen mit dem Fluoreszenzmikroskop untersucht.

3.1.2.3. Hämagglutinationstest (HA)

Der Hämagglutinationstest wurde nach Standardmikroverfahren (Anonym, 1982) durchgeführt:

Jeweils 25µl Antigen wurden auf 96-Loch-Rundbodenplatten (Fa. Greiner) in je 25µl NaCl-PP (pH 7,4) in Log₂ Schritten verdünnt. Dann wurden je 50 µl einer 0,5%igen Suspension von Hühnererythrozyten in physiologischer Kochsalzlösung zugegeben. Nach 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde abgelesen. Als HA-Titer wurde die Verdünnung angesehen, bei der noch eine vollständige Hämagglutination vorhanden war. Bei jedem Test wurde eine Erythrozytenkontrolle mitgeführt.

3.1.3. Virusreinigung

Zellkulturmaterial bzw. Allantoisflüssigkeit wurde 10 min bei 3000 x g zentrifugiert. Dieses geklärte Material wurde in einer Ultrazentrifuge (Rotor: Beckmann TI 45) 90 min bei 35000 rpm pelletiert. Das Viruspellet wurde in 0,5 ml TEN-Puffer (20mM Tris, 150mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 7,8) resuspendiert und über Nacht bei 4°C belassen. Nach Ultraschallbehandlung (3 x 1 sec) wurde es bei -70 °C gelagert.

Gradientengereinigtes Virusmaterial wurde erhalten, indem man 0,5 ml Pellet auf einen kontinuierlichen 20 - 60% igen Sucrosegradienten schichtete und in einem Beckmann SW 40 Rotor bei 35 000 rpm über 180 min zentrifugierte. Die deutlich sichtbare Bande wurde durch Punktion von der Seite gewonnen und nach Verdünnung mit TEN-Puffer zur Entfernung der Sucrose wie oben pelletiert, über Nacht bei 4 °C belassen, in 0,5 ml TEN-Puffer aufgenommen und bei -70 °C gelagert.

3.1.4. Vorbehandlung der Seren

Die Pferdeseren wurden im Rahmen der virologischen Diagnostik in den Jahren 1985-88 (Buchstaben A-D) gesammelt und bei -20 °C gelagert. Zur Inaktivierung bzw. Entfernung von unspezifischen Inhibitoren und Isoagglutininen wurden die Seren mit verschiedenen Methoden vorbehandelt. Die Pferde- und Frettchenseran wurden hitzeinaktiviert (56 °C, 30 min) und nach der Vorbehandlung bei -20 °C gelagert. Die Hitzeinaktivierung erfolgte bei der RDE-Methode nach der Behandlung, bei den anderen Verfahren vorher. Die Seren lagen nach der Behandlung in einer Verdünnung von 1:10 vor.

3.1.4.1. Vorbehandlung mit RDE

0,1 ml Serum wurden mit 0,4 ml RDE (V.Cholerae, Strain 4Z, WHO Coll. Center, Atlanta) verdünnt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Dann wurden 0,3 ml 2,5%iges Natriumcitrat und 0,2 ml PBS + 0,5% Natriumazid zur Konservierung zugegeben.

3.1.4.2. Vorbehandlung mit Kaolin und Adsorption an Hühnererythrozyten

0,1 ml Serum wurden in 0,5 ml PBS, pH 7,4 und 0,4 ml einer Suspension von 25% Kaolin (Bolin alba) in PBS verdünnt. Nach 10 Minuten Rütteln wurde das Kaolin durch Zentrifugation (2min, 500 x g) sedimentiert. Der Überstand wurde nun mit 0,3 ml einer konzentrierten Hühnererythrozytensuspension für 60 min bei 37 °C inkubiert. Die Erythrozyten wurden durch eine zweite Zentrifugation sedimentiert (Anonym, 1982).

3.1.4.3. Vorbehandlung mit Kaliumperiodat

0,1 ml Serum wurden mit je 0,3 ml einer 11 mM Kaliumperiodatlösung verdünnt. Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden 0,6 ml einer Glycerinlösung (0,5 % Glycerin in 0,85% NaCl) zugegeben und weitere 15 min inkubiert.

3.1.4.4. Protein G-Affinitätschromatographie

Ein Teil der Seren wurde über Protein G-Sepharose (Pharmacia, Freiburg) gereinigt. 100 µl Protein G-Sepharose in Prot G-Puffer A (20mM Na₂HPO₄, 20 mM NaH₂PO₄, pH 7,0) wurde in ein am unteren Ende perforiertes Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben. Dieses wurde in ein Reagenzglas eingehängt, in dem sich ein weiteres Eppendorf-Reaktionsgefäß zur Aufnahme des Eluates befand. Nach Zentrifugieren (3 min . 500 x g) wurde erneut Puffer aufgebracht und zentrifugiert. Die Mikrosäule war somit zur Aufnahme des Serums bereit. Nun wurden 50 µl Serum in 50 µl Puffer A auf die Säule gegeben und diese zur Bindung der Antikörper 20 min bei 4 °C inkubiert. Puffer und Serum wurde nun durch Zentrifugation eluiert (Fraktion A). Nach einmaligem Waschen mit dem zehnfachen Säulenvolumen an Puffer A wurde mit 400 µl Puffer B (0,1 M Glycin/HCl, pH 3,5) durch Zentrifugation eluiert (Fraktion E1) . Eine weitere Elution mit 100 µl Puffer B ergab die Fraktion E2. Die Seren wurden sofort mit 100 µl 1M Tris/HCl, pH 9,0 auf neutralen pH gepuffert.

3.1.5. Hämagglutinationshemmungstest (HAH)

Die HAH wurde nach Standardverfahren in Mikrotiterplatten durchgeführt (Anonym, 82). Das Antigen wurde im Vortest auf 4 HE/25 µl eingestellt. Auf 96-Loch Mikrotiter-Rundbodenplatten wurden Verdünnungsreihen mit 25 µl Serum in 25 µl NaCl-Phosphatpuffer angelegt und mit jeweils 25 µl Antigen beschickt. Die Platten wurden gerüttelt und 30 Minuten bei Raumtemperatur belassen. Nun wurden jeweils 50 µl einer 0,5% igen Hühnererythrozytensuspension zugegeben, 30 Minuten bei Raumtemperatur belassen und der Endtiter

bestimmt. Als hemmend wurden Verdünnungsstufen angesehen, bei denen sich ein glatter Erythrozytenknopf gebildet hatte, der bei Schräghalten der Platte in der gleichen Weise wie die Erythrozytenkontrolle auslief. Bei jedem Test wurde mindestens eine Antigenkontrolle, eine Erythrozytenkontrolle und eine Positivkontrolle mit einem positiven Frettschenserum durchgeführt. Zum Vergleich mit den Werten der SRH wurden die Titerstufen berechnet. Als Titerstufe wurde der Logarithmus zur Basis 2 der Verdünnung des Serums in Bezug zur Ausgangsverdünnung bezeichnet (d.h. HAH-Titer von 20, 40 und 80 entsprechen der Titerstufe 1, 2 und 3).

3.1.6. Single Radial Hemolysis (SRH)

Die Durchführung der SRH erfolgte im wesentlichen nach Schild et al. 1975. Schafblut wurde in Alsevers Lösung gewonnen und nach dreimaligem Waschen in NaCl/HEPES Puffer (0,85% NaCl, 0,05 M HEPES, 0,02% NaAzid, pH 6,5) eine 8%ige Erythrozytensuspension hergestellt. Von dieser Suspension wurden 2 ml zusammen mit 4 ml Virussuspension unterschiedlicher HA-Titer für 10 min bei 4°C inkubiert. Nach Zugabe von 2,5 ml 0,85%iger CrCl₃-Lösung wurde 5 min bei Zimmertemperatur inkubiert und 5 Minuten bei 500 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Erythrozyten in 8 ml HEPES-Puffer mit 0,5% BSA (Bovines Serumalbumin) resuspendiert. Nach erneutem Zentrifugieren und Absaugen des Überstandes wurden die Erythrozyten in 2 ml PBS'A (0,17 M NaCl, 3,3 mM KCl, 12 mM Na₂HPO₄, 2,5 mM KH₂PO₄) aufgenommen. Nach Zugabe von 0,3 ml Komplement aus Meerschweinchen Serum (Behring, Marburg) wurde die Erythrozytensuspension im Wasserbad auf 42°C erwärmt. Sie wurde nun zu 7,8 ml einer auf 42°C abgekühlten 1,5%igen Agarose-lösung (Pharmacia, Freiburg) in PBS'A gegeben und gründlich vermischt. Diese Mischung wurde dann in die Deckel von Plastikpetrischalen (100mm Durchmesser) gegossen. Nach Erkalten der Agarose wurden Löcher von 2mm Durchmesser in die Agarose gestanzt. Nun wurden je 5 µl der unverdünnten Seren aufgetragen. Auf jeder Platte wurde ein positives Referenzserum mitgetestet. Die Platten wurden für 10-16 Stunden bei 37°C in der feuchten Kammer inkubiert. Die Durchmesser der Hämolysehöfe und ihr Erscheinungsbild wurden

protokolliert. Alle Seren wurden vorher auf einer Platte ohne Antigen auf Hämolyse durch Anti-Erythrozytenantikörper getestet. Zur Auswertung wurden die Durchmesser der Hämolysehöfe herangezogen und mit den Titerstufen der HAH (s. dort) verglichen.

3.1.7. Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) zum Antikörpernachweis

3.1.7.1. Absorption der Seren an Antigen unterschiedlichen Subtypes

Für die Verwendung im ELISA wurden 100 µl Serum in einem Eppendorf Reaktionsgefäß in NaCl-Phosphatpuffer verdünnt und dazu jeweils 100µl eines Antigens fremder HA und NA (Sw/Germany/2/87(H1N1)) zugegeben. Nach Inkubation bei 37°C für 60 min bzw. 4°C über Nacht erfolgte die Durchführung des ELISA. Als Antigen wurde konzentriertes Antigen von 3200 HE 1:100 verdünnt in NaCl-PP, verwendet.

Die Absorption erfolgte daneben mit bereits in der Verdünnungsreihe vorliegenden Seren. Dazu wurden je 110 µl des Serums in log 2 Schritten in Blockpuffer verdünnt und das Antigen in gleicher Menge zugegeben. Als Antigen wurde in diesem Fall 1:5 in Blockpuffer verdünnte Allantoisflüssigkeit mit 64 HE verwendet.

3.1.7.2. Plattenbeschichtung

Für die Beschichtung der Platten wurde soweit nicht anders angegeben, folgende Antigene verwendet: A/Equi/Miami/1/64(H3N8) aus Zellkultur (8000 HE) 1:500 verdünnt; A/Equi/Kentucky/1/81(H3N8) aus Zellkultur (4000 HE) 1:500 verdünnt; A/Equi/Fontainebleau/79(H3N8) aus Zellkultur (2000 HE) 1:250 verdünnt. Das jeweilige Antigen wurde in Karbonat/Bikarbonatpuffer, pH 9,4-9,6 auf einen HA-Titer von 8-16 verdünnt und jede Vertiefung der Platte (Immuno II, Nunc, Wiesbaden) mit 100 µl beschickt. Danach erfolgte die Inkubation bei 37°C für 60 min, oder bei 4°C über Nacht. Die beschichteten Platten wurden bei 4°C gelagert.

3.1.7.2.1. Aufreinigung des Antigens mit Bromelain

Durch die Spaltung mit Bromelain werden Hämagglutininmoleküle erhalten, die durch Fehlen ihrer hydrophoben Ankerregion wasserlöslich sind. Die Behandlung erfolgte nach Brand und Skehel (1972).

37 mg Bromelain (Sigma) wurden in 2,5 ml Tris-EDTA (0,1 mM Tris-EDTA + Dithiotreitol) gelöst und davon 0,1 ml zu 0,9 ml gereinigtem Antigen aus Allantoisflüssigkeit (A/Equi/Miami/1/63(H3N8), 1280 HE A/Equi/Prague/1/65(H7N7), 1280 HE) gegeben. Nach 120 min Inkubation bei 37°C unter fortlaufendem Rühren wurde mit Tris-EDTA Puffer auf 3 ml aufgefüllt und 60 min bei 100 000 x g (Beckmann, TI 50) zentrifugiert. Der Überstand mit den abgespaltenen Projektionen wurde verwendet.

3.1.7.2.2. Aufreinigung des Antigens mit Lubrol

0,2 ml Antigen A/Sw/Germany/2/87(H2N2) (HA: 1280) bzw. A/Equi/Prague/1/56(H7N7) (HA:1280) wurden mit 4,8 ml 0,5%igem Lubrol in Tris/HCl, pH 8,1 für 60 min bei 4°C inkubiert (Wraith, 1987). Nach Zentrifugation (100 000 x g, 60 min) in einem TI 50 Rotor wurde der Überstand zur Beschichtung der Immunoplaten verwendet. Die Beschichtung der Platten erfolgte in einer Verdünnung von 1:10 in Karbonat/Bikarbonatpuffer, pH 9,4-9,6.

3.1.7.3. Durchführung des ELISAs

Die mit Antigen beschichteten Platten wurden vor Gebrauch vier Mal mit NaCl-Phosphat Puffer, dem 0,02% Tween 20 zugesetzt worden war, gewaschen und trockengeklopft. Von jedem Serum wurde eine Verdünnungsreihe in NaCl-Phosphat-Puffer mit 0,02% Tween 20 und 10% FKS angelegt und 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Platten vier Mal mit NaCl-Phosphat-Puffer mit 0,02% Tween 20 gewaschen.

Peroxidasemarkierte Anti-Pferd-IgG-Antiseren (Sigma, München) wurden 1:1000 in NaCl-PP (mit 0,02% Tween 20) verdünnt und je 100µl pro Vertiefung auf die Platte gegeben. Nach 30 min Inkubation bei 37°C erfolgte erneutes

Waschen und Zugabe von je 100 µl Substrat mit TMB (3'-3'-5'-5'-Tetramethylbenzidin; Serva, Heidelberg) als Indikator. Nach 10 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µl 2M Schwefelsäure gestoppt und die Extinktion mit einem Mehrkanal-Photometer (Titertek Multiscan MC, Flow Laboratories) bei 450 nm gemessen. Als Leerwert diente eine Spalte der Mikrotiterplatte, in die kein Pferdeserum pipettiert worden war.

3.1.7.4. Durchführung des Kompetitions-ELISAs

Der stammspezifische Nachweis von Antikörpern in Pferdeseren erfolgte auch mit Hilfe eines Kompetitions-ELISAs. Dazu wurden die mit Biotin markierten Kompetitoren in gleichen Mengen zu den logarithmisch verdünnten Seren gegeben und die Antikörper der Seren anhand der gesunkenen Extinktion des Kompetitors nachgewiesen.

Als Kompetitor wurden verschiedene monoklonale Antikörper, die gegen A/Equi/Miami/1/63(H3N8) gerichtet sind (Noe, 1986), sowie verschiedene Frettchenserum verwendet. Die Verdünnung der Kompetitoren lag in einem Bereich von 1: 100 bis 1: 250.

Die Verdünnungsreihe des zu testenden Serums wurde mit je 55 µl Serum in 55 µl NaCl-PP auf einer unbeschichteten Platte angelegt und dazu dann je 55 µl des Kompetitors gegeben. Davon wurden dann je 100 µl auf die beschichtete Platte transferiert und weiter wie oben verfahren.

3.1.7.4.1. Biotinkonjugierung

Die Biotinylierung erfolgte mit Biotin-X-NHS (Sigma). Der Proteingehalt des Eluates bzw. des Serums wurde photometrisch bestimmt (Johnstone, 1982) und mit NaCl-Phosphatpuffer auf 1 mg/ml eingestellt. Die Biotinkonjugierung des monoklonalen Antikörpers und des Frettchenserums erfolgte nach Peters et al. (Peters et al., 1982), modifiziert nach Chen (1987).

3.2. Ergebnisse

3.2.1. Züchtung in der Zellkultur

Eine Adaptierung gelang bei allen Stämmen des Subtyps 2. Die Ausbildung eines cpE erfolgte in den ersten Passagen deutlich später als in den höheren Passagen. In den ersten Passagen wurde ein cpE durchschnittlich nicht vor dem dritten Tag beobachtet, in späteren Passagen oft schon am nächsten Tag.

Nach Zugabe von FKS zum Erhaltungsmedium erfolgte keine Virusvermehrung mehr, nach ungenügendem Waschen mit proteinfreiem Medium war die Virusvermehrung stark gehemmt. Waschen der Monolayer mit Trypsinlösung verbesserte die Vermehrung nur wenig, Zugabe von Trypsin in den Adsorptionspuffer oder Inkubation des Antigens in trypsinhaltigem Puffer, sowie die Adsorption bei 4°C erbrachte keinen merklichen Erfolg.

In der fünften Passage wurde versucht, auf die Adsorption zu verzichten und das Virusmaterial zusammen mit dem Erhaltungsmedium aufzubringen. Dies resultierte in einem Abfall des HA-Titers um eine Stufe und dem verzögerten Auftreten des cpEs in darauffolgenden Passagen. Die Inkubation in Rollerflaschen bzw. das Rollen der Zellkulturröhrchen erwies sich als notwendig, da sich in stationärer Kultur nur HA-Titer von 1:4 - 1:8 ergaben. Der zeitliche Verlauf der Virusvermehrung wurde durch die HämadSORPTION untersucht. Die Vermehrung konnte meist schon nach acht Stunden und bereits vor dem Auftreten des cpEs nachgewiesen werden. Die Bestimmung des HA-Titers erfolgte nach vollständiger Ausbreitung des cpEs. Die höchsten HA-Titer ergaben sich, wenn die Zellkultur erst nach der vollständigen Lyse der Zellen geerntet wurden. A/Eq/Miami/1/63(H3N8) erreichte nach zehn Passagen im Röhrchen HA-Titer von maximal 1:256. Die Titer der anderen Stämme lagen zwischen 1:32 und 1:128. Die HA-Titer der durch Kultur in Rollerflaschen erhaltenen Zellkulturüberstände lagen je nach Stamm zwischen 1:32 und 1:128.

Der Influenzavirusstamm A/Eq/Prague/1/56(H7N7) erreichte in der ersten Passage maximale HA-Titer von 1:4, später konnte keine Virusvermehrung mehr beobachtet werden. Auf weitere Passagierungsversuche wurde deshalb verzichtet.

3.2.2. Immunofluoreszenz

Die Virusvermehrung konnte durch Markierung infizierter Zellen mit dem monoklonalen Antikörper 7/12 nachgewiesen werden. Ca. acht Stunden p.i. wurde die Kernmembran deutlich durch leuchtend gelbe Granula dargestellt, ca. zwölf Stunden p.i. das gesamte Zytoplasma.

3.2.3. Hämagglutinationshemmungstest (HAH)

3.2.3.1. Vergleich von HAH Titern von Seren nach Vorbehandlung mit RDE, Kaliumperiodat und Kaolin

46 Pferdeseren wurden im HAH Test nach unterschiedlichen Vorbehandlungen auf Mikrotiterplatten jeweils nebeneinander getestet. Dadurch konnte die versuchsbedingte Variation auf ein Minimum verringert werden. Tab. 1 zeigt die Abweichungen zwischen den HAH-Titern der einzelnen Verfahren. Zwischen den Vorbehandlungen mit RDE und Kaliumperiodat bewegten sich die Titer im Bereich von einer Stufe ($R = 0,980$). Zwischen der Behandlung mit Kaolin und den beiden anderen Vorbehandlungen KPJ bzw. RDE wurden hingegen in zwei Fällen Abweichungen von zwei Titerstufen gefunden. 13 bzw. 20 Seren zeigten eine Abweichung von einer Titerstufe ($Kao/KPJ: R = 0,930$; $Kao/RDE: R = 0,941$)

Abweichung	Behandlungsverfahren			
	RDE/Kao	RDE/KPJ	Kao/KPJ	RDE/Kao/KPJ
Gleiche Titerstufe:	31	38	24	23
1 Stufe Abweichung:	13	8	20	21
2 Stufen Abweichung:	2	-	2	2

Tabelle 1: Abweichung der HAH-Titer von 46 Seren nach Vorbehandlung mit RDE, Kaolin und KPJ

RDE: Receptor destroying enzyme; KPJ: Kaliumperiodat;

Kao: Adsorption an Kaolin und Hühnererythrozyten

Antigen: A/Eq/Miami/1/63(H3N8), 4 HE

3.2.3.2. Reinigung der Seren durch Protein G-Affinitätschromatographie

Die Verwendung von Mikrosäulen und der Zentrifugationstechnik (Peters et al., 1986; Chen, 1988) erlaubt die Adsorption von Antikörpern an Protein G und ihre Elution in einem definierten Volumen an Puffer. Das Eluat enthält die gereinigten Antikörper im Zehnfachen der Ausgangsverdünnung; dies entspricht der Verdünnung, die durch die anderen Vorbehandlungen erhalten wird. Das Eluat konnte außerdem nach Zugabe eines Tris/HCl- Puffers, pH 9 direkt im HAH Test eingesetzt werden, ohne die Lyse der Erythrozyten zu provozieren. Die durch Zentrifugation eluierten Fraktionen einer Reihe von Seren wurden in der HAH auf ihren Gehalt an hemmenden Substanzen geprüft. Der Vergleich von acht gleichzeitig zentrifugierten Seren zeigt den Erfolg der Reinigung durch die Affinitätschromatographie (Tab. 2). Bereits in der Adsorptionsfraktion, nach Auftragen der Seren auf die Säule, wurden hemmende Substanzen eluiert. Ihre Konzentration entsprach nicht den für das Serum gefundenen spezifischen Hemmtitern, sondern trat unabhängig davon auf.

Die mit Elutionspuffer erhaltene Fraktion 1 entsprach in ihrem HAH-Titer dem nach anderen Vorbehandlungen gefundenen HAH-Titer. Waren sehr viele Antikörper an die Säule gebunden, so reichte die Menge des verwendeten Elutionspuffers nicht aus, um alle Antikörper zu eluieren. Diese erschienen dann in der nachfolgenden Fraktion. Die Menge des ersten Elutionspuffers wurde mit 500 µl so gewählt, daß die in der zweiten Fraktion enthaltenen Antikörper vernachlässigt werden konnten. Daher wurde für weitere Untersuchungen nur die Fraktion des Elutionspuffers 1 verwendet.

Der Vergleich von Reinigung über Protein G und konventionelle Vorbehandlungen ergab bei zwei von 40 Seren eine signifikante Abweichung der HAH-Titer bei der Vorbehandlung mit RDE und Kaolin (Tab. 3). Bei sechs von 40 mit KPJ vorbehandelten Seren wurden signifikante Abweichungen gesehen. Die Korrelationen zwischen den HAH-Titerstufen der Protein-G gereinigten Seren und den Titerstufen der mit RDE, Kaolin oder Kaliumperjodat vorbehandelten Seren wurden berechnet (Abb. 3). Für die RDE Behandlung wurde eine Korrelation von $R = 0,81$ gefunden, bei einer Steigung der Regressionsgeraden von 0,99. Mit der Kaolinbehandlung ergab sich $R = 0,63$, mit $a = 0,98$. Der Faktor für Kaliumperjodat wurde mit $R = 0,82$ berechnet, mit $a = 1,07$.

Fraktionen	Seren							
	B21	B42	A175	A182	A186	A187	A188	A189
Adsorptionspuffer	0	0	20	0	80	20	0	0
Elutionspuffer 1	0	20	80	20	40	160	160	0
Elutionspuffer 2	0	0	0	0	0	40	0	0

Tabelle 2: HAH-Titer der durch Zentrifugation aus der Affinitätschromatographiesäule eluierten Fraktionen. Die Seren wurden in Adsorptionspuffer auf die Säule aufgetragen und mit Elutionspuffer eluiert. Antigen: A/Eq/Miami/1/63(H3N8), 4HE
Angabegeben sind die reziproken Werte.

Abweichungen	Vorbehandlung		
	RDE	KPJ	Kao
Gleiche Titerstufe	22	22	18
1 Stufe Abweichung	16	12	20
2 Stufen Abweichung	2	6	2

Tabelle 3: Vergleich der HAH-Titer von Protein-G gereinigten Seren mit den HAH-Titern der entsprechenden Seren nach Vorbehandlung mit Receptor destroying enzyme (RDE), Kaliumperjodat (KPJ) und Kaolin (Kao)
Anzahl der Seren: 40; Antigen: A/Eq/Miami/1/63(H3N8); 4 HE

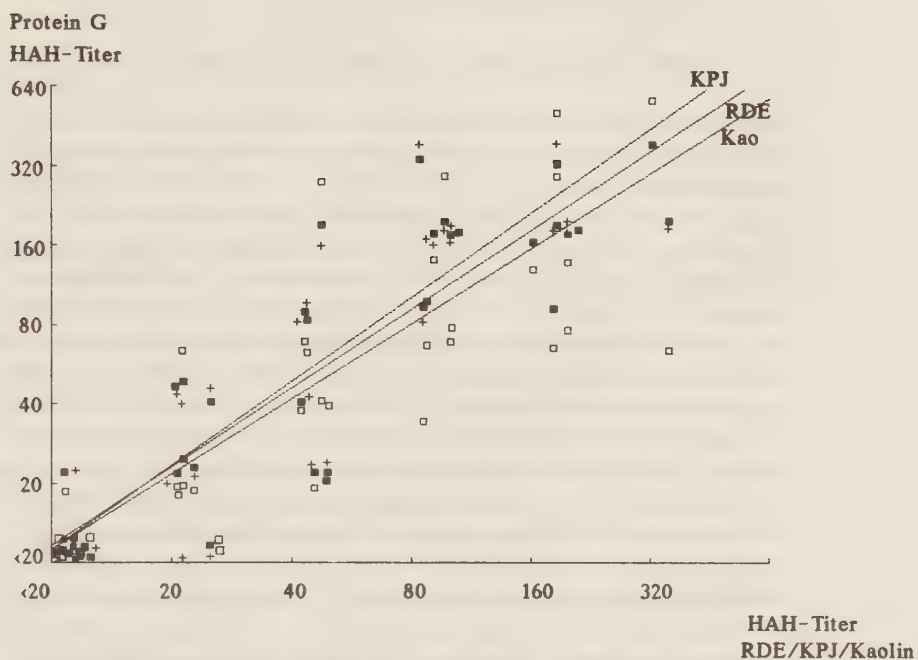


Abbildung 3: Vergleich der HAH-Titer von 40 Seren nach Reinigung durch Protein G-Affinitätschromatographie und nach Vorbehandlung mit RDE, Kaolin und Kaliumperjodat
ausgefülltes Quadrat: RDE; leeres Quadrat: KPJ; Kreuz: Kaolin
Linien: Regressionsgeraden
Angegeben sind die reziproken Werte der HAH-Titer.
Zu den Werten wurde zur besseren Darstellung gleicher Ergebnisse 0,1-0,3 der Skaleneinteilung addiert, die Korrelation wurde jedoch mit den Originalwerten berechnet.

3.2.4. Single Radial Hemolysis (SRH)

3.2.4.1. Einfluß des HA-Titers auf die Qualität der Hämolyse

Die Möglichkeit ungereinigte und nicht konzentrierte Allantoisflüssigkeit als Antigenquelle in der SRH zu verwenden, wird von vielen Autoren als großer Vorteil gewertet (Russell et al., 1975; Schild et al., 1975). Humane Influenzastämme vermehren sich im bebrüteten Hühnerei bis zu HA-Titern von 1:1024. Solche hohen Titer werden bei equinen Influenzastämmen nicht beobachtet. Es wurde deshalb untersucht, inwieweit sich unkonzentrierte, geklärte Allantoisflüssigkeit mit einem HA-Titer von 1:32-1:128 als Antigen in der SRH verwenden läßt. Untersuchungen mit verschiedenen Influenzavirusstämmen zeigten ausgeprägte stammspezifische Unterschiede. Unter 128 HE zeigten nur die Stämme A/Eq/Fontainebleau/79(H3N8) und A/Eq/Sao Paulo/2/69(H3N8) klare, gut ablesbare Hämolysen. Die Stämme A/Eq/Kentucky/1/81(H3N8) und A/Eq/Solvalla/79(H3N8) zeigten zwar keine vollständigen Hämolysen, jedoch konnten die Grenzen der Hämolysezonen eindeutig bestimmt werden. Bei den Stämmen A/Switzerland/2225/79(H3N8) und A/Eq/Algier/1/72(H3N8) reichten die Virusmengen nicht aus, um ablesbare Hämolysen zu erzeugen. A/Eq/Miami/1/63(H3N8) zeigt auch bei Verwendung von 128 HE keine klaren Hämolysen. Bei Verwendung von konzentriertem Antigen mit 400 HE zeigten die Platten der getesteten Stämme A/Eq/Miami/1/63(H3N8), A/Eq/Kentucky/1/81(H3N8), A/Eq/Fontainebleau/79(H3N8) und A/Eq/Solvalla/79(H3N8) klare Hämolysen.

3.2.4.2. Einfluß des HA-Titers des verwendeten Antigens auf die Größe der Hämolysehöfe

An zwei verschiedenen Tagen wurden je zwei Platten mit A/Eq/Miami/1/63(H3N8) von 128 und 32 HE hergestellt und mit 5 Seren beschickt. Tab. 4 zeigt die Durchmesser der erhaltenen Hämolysezonen. An beiden Tagen war eine deutliche Vergrößerung der Hämolysehöfe zu beobachten, wenn zur Sensibilisierung der Erythrozyten Antigen mit niedrigerem HA-Titer verwendet wurde.

HA-Titer:	Versuch 1		Versuch 2	
	1:128	1:32	1:128	1:32
Seren:				
1. Anti-Miami	14,5	16	13	15
2. Anti-Font	8 P	9,5 P	10 P	11 P
3. C 346	4	4,5	3,5	4,5
4. C 395	4	4,5	3,5	4
5. C 358	4	4,5	3,5	4

Tabelle 4: Auswirkung unterschiedlicher HA-Titer des zur Sensibilisierung der Erythrozyten verwendeten Antigens auf die Größe der Hämolysezonen.

Angegeben sind die durchschnittlichen Durchmesser der Hämolysezonen von zwei Frettchen- (1, 2) und drei Pferdeseren (3-5), die jeweils im Doppelansatz getestet wurden.

Antigen: A/Eq/Miami/1/63(H3N8) Allantoisflüssigkeit

P: partielle Hämolyse

3.2.4.3. Einfluß der Inkubationszeit von SRH-Platten auf die Hämolyse

Die Platten wurden nach der Beschickung mit den Seren in einer feuchten Kammer bei 37 °C inkubiert. Nach etwa einer Stunde wurden die ersten Hämolysezonen sichtbar. Wurden die Platten nach zwei Stunden abgelesen, lagen die Werte für die Durchmesser positiver Seren eng beieinander. Nach längerer Inkubation vergrößerten sich die Unterschiede. Nach etwa 10 Stunden Inkubation wurde die maximale Ausdehnung erreicht, eine Verlängerung um weitere zehn Stunden erbrachte keine Vergrößerung der Hämolysezonen um mehr als 0,5 mm.

3.2.4.4. Erscheinungsbild der Hämolysen

SRH Platten sind von diffuser, dunkel- bis hellroter Farbe. Hämolysezonen sind dadurch gekennzeichnet, daß die rote Farbe durch die Auflösung der Erythrozyten völlig verschwindet und das Agarosegel durchsichtig wird.

Von diesem Erscheinungsbild wurden einige Abweichungen beobachtet:

Partielle Hämolyse: Eine Zone der Hämolyse war eindeutig auszumachen,

jedoch waren nicht alle Erythrozyten aufgelöst, so daß normale Schrift nur schlecht durch die Platte zu lesen war. Partielle Hämolysen unterschieden sich eindeutig von danebenliegenden klaren Hämolysen, variierten aber in der Stärke der Hämolyse. Undeutliche partielle Hämolysen konnten gegen UV-reiches Licht (Leuchtstoffröhre oder Sonnenlicht) gut erkannt werden. Doppelzonenbildung: Innerhalb einer oft partiellen und unscharf begrenzten Zone fand sich eine deutlich abgesetzte, zweite Zone klarer Hämolyse. Roter Ring: Dunkle (hämolytische) Seren erzeugten einen etwa 2 mm breiten roten Ring, der von einer partiellen Hämolyse abgegrenzt werden mußte. Übergänge: Der Übergang von der Hämolyse zum Gel erschien fließend. Dieses Phänomen war oft über die Hälfte des Durchmessers feststellbar.

3.2.4.5. Relation von Serumverdünnung und Größe der Hämolysen

Die Beziehung zwischen der Verdünnung eines Serums in $\log_2$ -Schritten und der Größe der daraus resultierenden Hämolysehöfe wurde untersucht. Es wurde eine eindeutige Korrelation der Verdünnungsstufen mit den erhaltenen Durchmessern gefunden. Der Korrelationskoeffizient zwischen Verdünnungsstufen und Durchmesser wurde für die vier getesteten Stämme bestimmt: Für Miami ergab sich $R = 0,98$, für Kentucky $R = 0,975$, für Fontainebleau $R = 0,976$ und für Solvalla $R = 0,985$. Die Steigung der Geraden lag zwischen $a = 0,73$ (Fontainebleau) und $1,2$ (Solvalla). Abb. 4 zeigt die lineare Beziehung zwischen dem Durchmesser der Hämolysezonen und der Verdünnungsstufe.

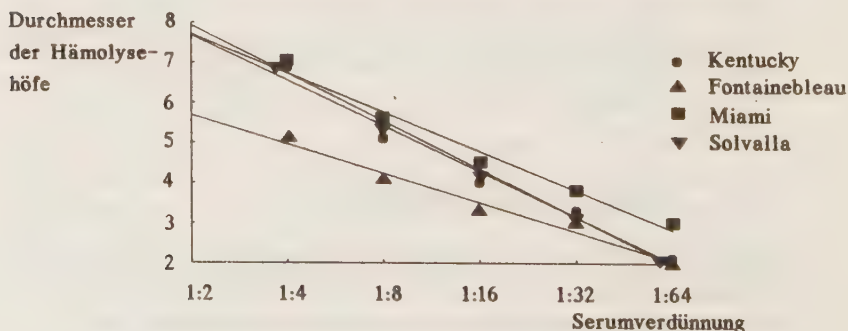


Abbildung 4: Relation von Serumverdünnung und Durchmesser der Hämolyse in der SRH.

Für jeden Stamm wurde das gleiche Serum zunächst in $\log_2$ -Schritten verdünnt und auf die Platte aufgetragen. Angegeben sind die Durchmesser der erhaltenen Hämolysehöfe und die Verdünnungen. Zusätzlich sind die Regressionsgeraden eingezeichnet.

3.2.4.6.1. Variation innerhalb von Platten

Die Variation der Ergebnisse gleicher Seren innerhalb einer Platte wurden untersucht. Zwei Platten wurden mit den Antigenen Kentucky und Fontainebleau (jeweils 400 HE) wurden 35 mal mit je 5 μ l eines unverdünnten Serums mit einem HAH Titer von 1:80 beschickt. Die Durchmesser der Hämolysezonen wurden mit einer Schieblehre auf 0,1 mm genau gemessen und der Variationskoeffizient berechnet. Bei einem durchschnittlichen Durchmesser von 5,2 bzw. 5,7 mm und einer Standardabweichung von 0,18 bzw. 0,24 mm ergab sich ein Variationskoeffizient von 3,6 bzw. 4,2 %.

3.2.4.6.2. Variation zwischen Platten

Am gleichen Tag wurden 3x3 Platten mit je fünf Seren unterschiedlicher Titer beschickt. Von den 15 Seren zeigten fünf das gleiche Ergebnis (Ablesegenauigkeit 0,5 mm). Zehn Seren zeigten Abweichungen von max. 1,5 mm. Der Variationskoeffizient betrug im Durchschnitt 3,7% bei einer Spannweite von 0 - 9,1 %.

3.2.4.6.3. Variation zwischen Tests

An zwei verschiedenen Tagen wurden je 22 Seren getestet. Die erhaltenen Werte für die Durchmesser der Hämolysen wurden verglichen. Die durchschnittliche Variation der Seren betrug 4,47 %, die maximale Variation jedoch 15,7%.

3.2.4.7.1. Verhalten von monoklonalen Antikörpern

Die neuraminidasehemmenden MAKs 2/1 und 4/2 (Noe, 1986) wurden unverdünnt und in einer Verdünnung von 1:10 getestet, und erzeugten in keinem Fall eine Hämolyse. Die hämagglutinationshemmenden MAKs wurden in der Verdünnung 1:10 und 1:100 untersucht. Der MAK 7/12 zeigte eine sehr schwache partielle Hämolyse gegen das Antigen Kentucky, alle anderen Hämolysen waren klar. Die Hämolysezonen des MAK 7/12 gegen das Antigen A/Eq/Miami/1/63(H3N8) waren scharf begrenzt, die Zonen der anderen MAKs waren fließend.

Tabelle 5 zeigt die HAH-Titer und SRH-Durchmesser der monoklonalen Antikörper in der Verdünnung 1:10.

MAK	7/12		8/4		3/1	
Antigen	HAH	SRH	HAH	SRH	HAH	SRH
Miami	256	5	640	4	640	5
Prag	<20	0	<20	0	<20	0
Kentucky	<20	6P	1280	4	1280	4
Fontainebleau	<20	0	1280	4	1280	4
Solvalla	<20	0	1280	4	1280	4

Tabelle 5: Vergleich von HAH-Titern und SRH-Durchmessern von monoklonalen Antikörpern in der Verdünnung 1:10; P: partielle Hämolyse
Angabe sind die reziproken Werte der HAH-Titer und die SRH-Durchmesser in Millimetern

Antigen:	Miami		Kentucky		Fontainebleau		Solvalla	
	SRH	HAH	SRH	HAH	SRH	HAH	SRH	HAH
Anti-Serum:								
α-Miami	10/13 P	»2560	8	1280	6,5	320	7	640
α-Kent	5	160	10	1280	9 P	320	8	640
α-Fontainebl.	7 P	160	7	1280	10 P	640	11	1280
α-Solvalla	2,5	<20	7 P	320	10 P	<20	8	640
α-Prague	0	<20	0	<20	0	<20	0	0

Tabelle 6: Vergleich der HAH-Titer und Hämolyse Durchmesser (mm) von Referenzfrettschenseren; P: Partielle Hämolyse
Bei den HAH-Titern sind die reziproken Werte angegeben

3.2.4.7.2. Verhalten von Frettschen-Postinfektionsseren

Das Verhalten von Referenzseren gegen homologes und heterologes Antigen wurde untersucht. Die Hämolysen der meisten Seren waren klar und scharf begrenzt. Beim Antigen Fontainebleau wurden jedoch bis auf das Serum Anti-Miami nur partielle Hämolysen gesehen. Partielle Hämolysen erzeugten auch die Seren Anti-Fontainebleau beim Antigen Miami und Anti-Solvalla beim Antigen Kentucky. Beim Antigen Miami zeigte das homologe Antiserum eine zusätzliche partielle Hämolyse (Tab. 6).

3.2.4.8. Vergleich von SRH und HAH bei Pferdeseren

Zum direkten Vergleich von HAH und SRH wurden 159 Pferdeseren, die im Rahmen der virologischen Diagnostik gesammelt wurden, auf Antikörper gegen die fünf in der Routinediagnostik am Institut verwendeten Stämme untersucht. Die Platten waren im allgemeinen gut ablesbar und zeigten klare Hämolysezonen. Partielle Hämolysen und das Auftreten von unscharfen Randzonen waren auf einzelne Seren beschränkt.

Zur Sensibilisierung der Erythrozyten wurde bei den Stämmen des Subtyps Equi 2 Virus aus Zellkultur verwendet. Beim Stamm Prague wurde Virus aus Allantoisflüssigkeit verwendet, beim Stamm Miami beides.

In der mit dem Antigen Miami aus Zellkultur sensibilisierten Platte wurden keine rein partiellen Hämolysen beobachtet. In neun Fällen kam es jedoch zur Bildung von Doppelzonen mit klarer Hämolyse im Zentrum und partieller Hämolyse am Rand. Der Grad der erreichten Hämolyse war etwas geringer als bei den Platten, die mit Virus aus Allantois sensibilisiert wurden. Hier waren die hämolysierten Bereiche klarer und die Grenzen schärfer. Bei elf Seren konnten doppelte Zonen erkannt werden. Bei zehn Seren wurden ausschließlich partielle Hämolysen gesehen. Die Korrelation mit den Titerstufen der HAH wurde bei RDE behandelten Seren mit $R = 0,87$ gefunden (Abb. 5). Klare Hämolysen mit scharf begrenzten Rändern wurden auch bei den Platten beobachtet, die mit dem aus Allantoisflüssigkeit gewonnenen Antigen Prague sensibilisiert worden waren. In 40 Fällen traten hier doppelte Zonen auf. Bei sieben Seren wurden partielle Hämolysen beobachtet. Der Vergleich mit den Titerstufen der HAH mit RDE behandelten Seren ergab eine Korrelation von $R = 0,884$ (Abb. 6). Die mit dem Antigen Kentucky bereiteten Platten zeigten schwächere Hämolysen, waren jedoch gut abzulesen. In einem Fall trat Doppelzonenbildung auf, in zwölf Fällen waren die Hämolysen nur partiell, in drei Fällen erschien die

Grenze der Hämolyse unscharf. Der Korrelationskoeffizient zwischen HAH von RDE behandelten Seren und den Durchmessern der SRH mit Antigen aus Allantoisflüssigkeit wurde mit $R=0,806$ bestimmt (Abb. 7).

Auch beim Stamm Fontainebleau wurden in der SRH mit Antigen aus Allantoisflüssigkeit in vier Fällen Doppelzonen beobachtet. Vier Seren zeigten partielle Hämolyse. Die Korrelation mit den Werten der HAH von RDE-behandelten Seren ergab $R=0,794$ (Abb. 8).

Bei den Platten des Stammes Solvalla ergab sich in zwei Fällen die Bildung einer Doppelzone und in elf Fällen partielle Hämolysen ($R=0,855$; Abb. 9).

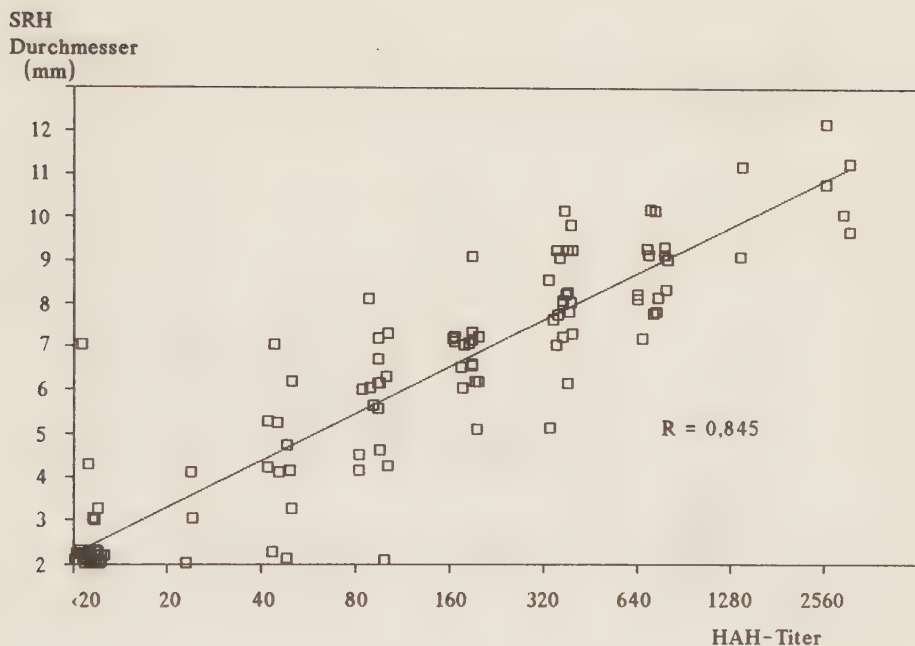


Abbildung 5: Vergleich von SRH-Durchmessern und HAH-Titern (reziproke Werte) von 120 Pferdeseren
Antigen: A/Eq/Miami/1/63(H3N8), Allantois, 256 HE
Die Seren der HAH waren mit RDE vorbehandelt.
Zu den Werten wurde zur besseren Darstellung gleicher Ergebnisse 0,1-0,3 der Skaleneinteilung addiert, die Korrelation und Regression wurden jedoch mit den Originalwerten berechnet.

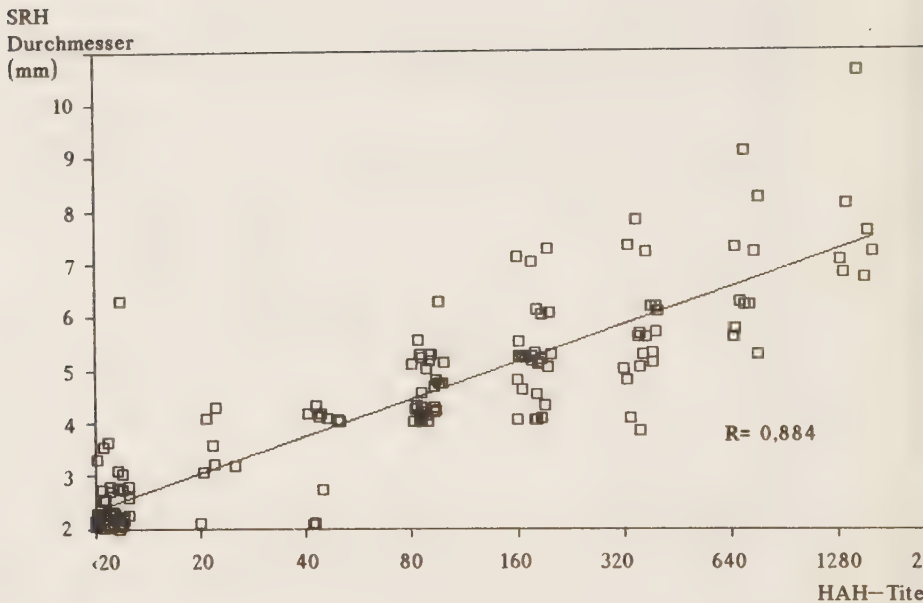


Abbildung 6: Vergleich der SRH-Durchmesser und HAH-Titer von 159 Pferdeseren
Antigen: A/Eq/Prague/1/56(H7N7), Allantois, 256 HE
Bei den HAH-Titern sind die reziproken Werte angegeben
Zu den Werten wurde zur besseren Darstellung gleicher Ergebnisse
0,1-0,3 der Skaleneinteilung addiert, die Korrelation und Regression
wurden jedoch mit den Originalwerten berechnet.

SRH

Durchmesser
(mm)

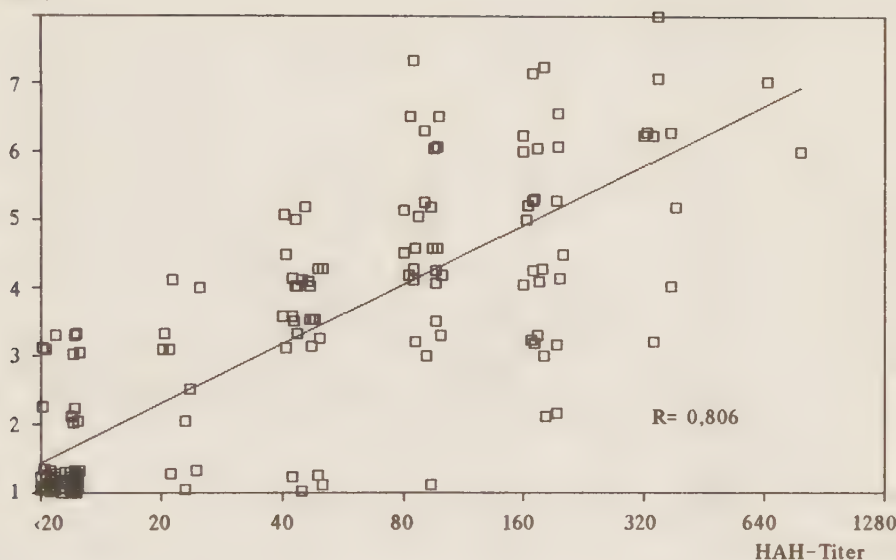


Abbildung 7: Vergleich der SRH-Durchmesser und HAH-Titer von 159 Pferdeseren
Antigen: A/Eq/Kentucky/1/81(H3N8), Zellkultur, 400 HE
Bei den HAH-Titern sind die reziproken Werte angegeben
Zu den Werten wurde zur besseren Darstellung gleicher Ergebnisse
0,1-0,3 der Skaleneinteilung addiert, die Korrelation und Regression
wurden jedoch mit den Originalwerten berechnet.

SRH

Durchmesser
(mm)

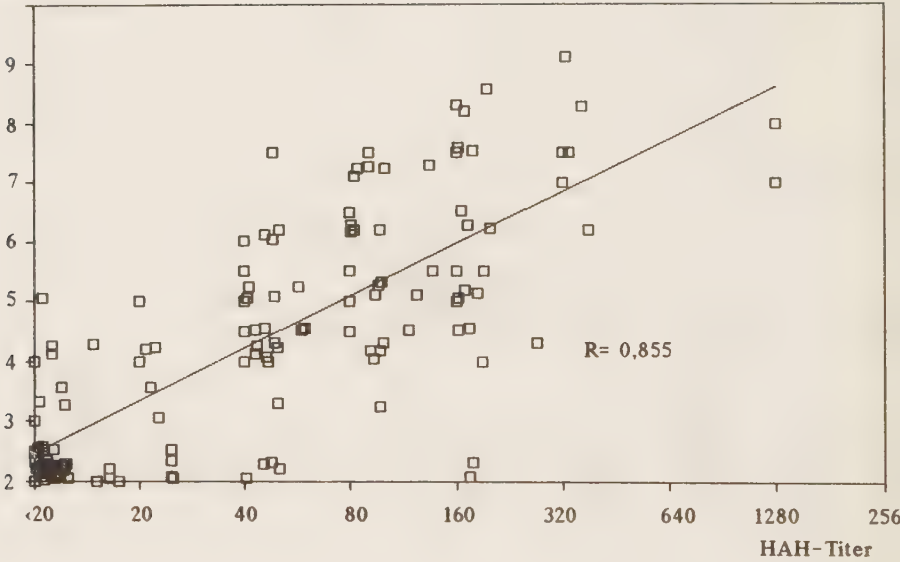


Abbildung 8: Vergleich der SRH-Durchmesser und HAH-Titer von 159 Pferdeseren
Antigen: A/Eq/Fontainebleau/79(H3N8), Zellkultur, 400HE
Bei den HAH-Titern sind die reziproken Werte angegeben
Zu den Werten wurde zur besseren Darstellung gleicher Ergebnisse
0,1-0,3 der Skaleneinteilung addiert, die Korrelation und Regression
wurden jedoch mit den Originalwerten berechnet.

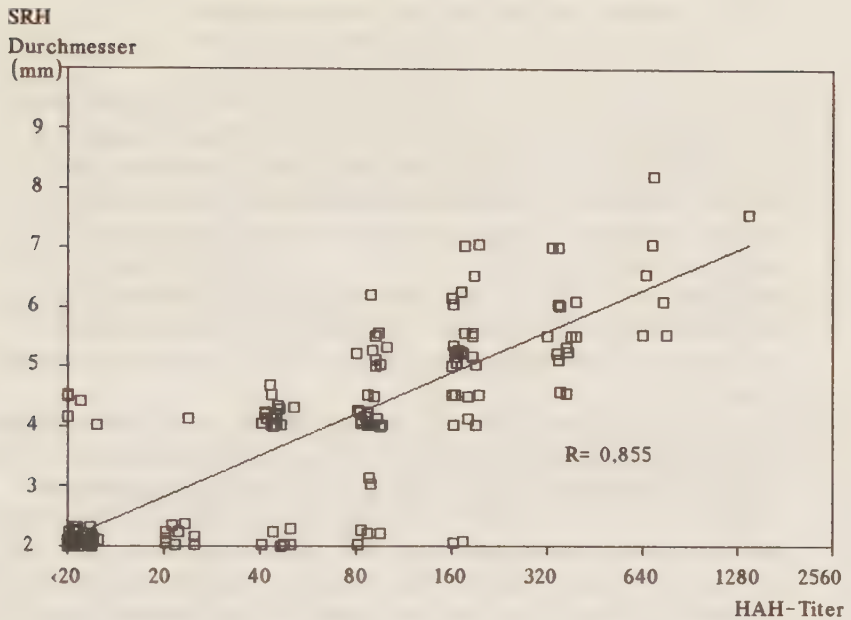


Abbildung 9: Vergleich der SRH-Durchmesser und HAH-Titer von 159 Pferdeseren
Antigen: A/Eq/Solvalla/79(H3N8), Zellkultur, 400 HE
Bei den HAH-Titern sind die reziproken Werte angegeben
Zu den Werten wurde zur besseren Darstellung gleicher Ergebnisse
0,1-0,3 der Skaleneinteilung addiert, die Korrelation und Regression
wurden jedoch mit den Originalwerten berechnet.

3.2.4.9. Vergleich der HAH und SRH mit unterschiedlich behandelten Seren und unterschiedlichem Antigen

120 Seren wurden mit dem Antigen Miami in fünf Varianten getestet. Die SRH wurde mit Antigen aus Allantoisflüssigkeit und aus Zellkultur durchgeführt. Die HAH wurde mit Antigen aus Allantoisflüssigkeit durchgeführt, wobei die Seren mit RDE oder mit Kaolin vorbehandelt worden waren. Ebenfalls verglichen wurde die HAH mit Antigen aus Zellkultur und mit durch RDE vorbehandelten Seren.

Die Ergebnisse der fünf Nachweise wurden auf ihre Korrelation untereinander untersucht (Tab. 7). Die beste Korrelation mit $R = 0,885$ wurde zwischen der HAH mit RDE vorbehandelten Seren und der HAH der mit Kaolin behandelten Seren gefunden.

Die anderen Verfahren mit Antigen aus Allantoisflüssigkeit erreichten ähnliche Korrelationsfaktoren mit $R = 0,870$ (SRH/Allantois - HAH/Kaolin; Abb. 10) und $R = 0,845$ (SRH/Allantois - HAH/RDE; Abb. 9). Die Übereinstimmung der Nachweise mit Zellkulturmaterial war etwas geringer: $R = 0,839$ zwischen HAH mit Antigen aus Allantoisflüssigkeit bei RDE behandelten Seren und $R = 0,821$ bei der Kombination SRH/Allantois - RDE/Zellkultur. Eine ähnliche Beziehung wird bei der HAH gefunden, wenn der Nachweis mit Antigen aus Allantoisflüssigkeit und kaolinbehandelten Seren mit Antigen aus Zellkultur und RDE behandelten Seren verglichen wird ($R = 0,794$).

Davon heben sich die geringeren Korrelationen zwischen der SRH mit Zellkulturmaterial und der HAH mit Allantoisflüssigkeit deutlich ab. Die Korrelation wurde bestimmt für Antigen aus Allantois und RDE behandelten Seren mit $R = 0,692$ und für kaolinbehandelte Seren mit $R = 0,680$.

Die geringste Korrelation wurde gefunden zwischen der SRH mit Antigen aus Allantoisflüssigkeit und der SRH aus Zellkultur mit $R = 0,657$ (Abb. 11) und für die SRH mit Zellkulturmaterial und die HAH mit Antigen aus Zellkultur und RDE behandelten Seren ($R = 0,649$).

SRH			SRH	HAH		
	Antigen aus:		Allantois	Zellkultur	Allantois	
		Seren:	unb.	RDE	RDE	Kaolin
	Zellkultur	unb.	0,657	0,649	0,692	0,680
	Allantois	unb.		0,821	0,845	0,870
HAH	Zellkultur	RDE			0,839	0,794
	Allantois	RDE				0,885

Tabelle 7: Korrelationen zwischen HAH und SRH mit unterschiedlichen Antigenen und Serumvorbehandlungen. In die Berechnung gingen die Hämolyse-durchmesser bzw. Titerstufen der HAH von 120 Pferdeseren ein.

Kaolin

HAH-Titer

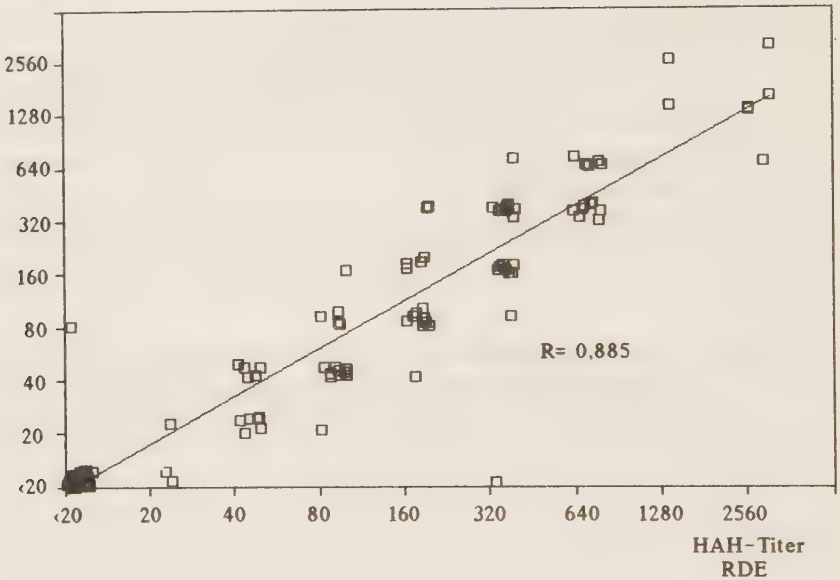


Abbildung 10: Vergleich der HAH-Titer von 120 Pferdeseren

Antigen: Miami Allantois 4 HE

X-Achse: Seren RDE behandelt

Y-Achse: Seren Kaolin behandelt

Zu den Werten wurde zur besseren Darstellung gleicher

Ergebnisse 0,1-0,3 der Skaleneinteilung addiert, die Korrelation und Regression wurden jedoch mit den Originalwerten berechnet.

Allantois

SRH-Durchmesser
(mm)

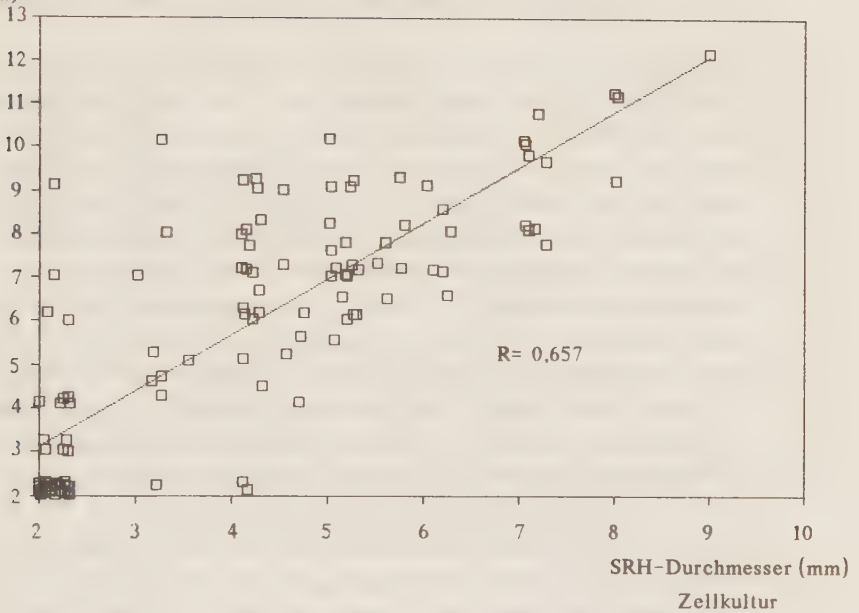


Abbildung 11: Vergleich von SRH Durchmessern von 120 Pferdeseren
X- Achse: Miami Zellkultur 400 HE
Y -Achse: Miami Allantois 256 HE
Die Seren wurden unverdünnt und unbehandelt eingesetzt.
Zu den Werten wurde zur besseren Darstellung gleicher
Ergebnisse 0.1-0.3 der Skaleneinteilung addiert. die Korrelation
und Regression wurden jedoch mit den Originalwerten berechnet.

3.2.5. Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)

3.2.5.1. Maßnahmen zur Vermeidung unspezifischer Bindung von Antikörpern

Die verwendeten Pferdeseren zeichneten sich im ELISA durch eine teilweise starke Bindung an unspezifische Strukturen aus. Diese Bindung konnte auf Antikörper der IgG-Klasse zurückgeführt werden, da die unspezifische Reaktion auch nach Reinigung der Seren über Protein G erhalten blieb. Eine größere Anzahl von Seren wurde deshalb zuerst gegen unbeschichtete Platten getestet und Seren mit ausgeprägter Bindung ausgewählt. Durch verschiedene Maßnahmen wurde nun versucht, die Reaktion dieser 'klebrigen' Seren gegen die Leerplatte zu unterdrücken. Um die freien Bindungsstellen der ELISA-Platten abzusättigen, wurden die Platten vor dem Auftragen der Seren mit 10% FKS in PBS beschickt und inkubiert. Die Bindung der Antikörper sank daraufhin ab. Ein Nachteil dieser Methode war jedoch die Verlängerung des Testes durch die zusätzliche Inkubation der Platten mit FKS. Aus diesem Grund wurde versucht, durch die Zugabe blockierender Substanzen in den Verdünnungspuffer des Serums die unspezifisch bindenden Antikörper abzubinden.

Einen sehr geringen Einfluß hatte 0,5%iges BSA, das weder alleine, noch in Kombination mit Tween 20, die Bindung der Seren an die leere Platte verhindern konnte. Als besser geeignet erwies sich FKS, das bereits in Konzentrationen von 5% den Hintergrund wesentlich erniedrigte. Die Zugabe von Tween 20 verringerte die Bindung an die Platte nur noch wenig (Abb. 12). Bei allen späteren ELISAs wurden die Seren deshalb in einem Blockpuffer mit 10% FKS und 0,05% Tween 20 verdünnt.

Weiterhin wurde untersucht, ob das Blocken der Platte durch die Verdünnung der Seren in Blockpuffer ersetzt werden kann. Abb. 13 zeigt verschiedene Kombinationen der beiden Methoden. Während es bei allen Methoden zu einer gleichmäßigen Reduktion der Bindung an die Leerplatte kommt, zeigt die Verdünnung der Seren in Blockpuffer eine etwas geringere Unterdrückung der Antikörperbindung gegen die mit Antigen beschichteten Platte.

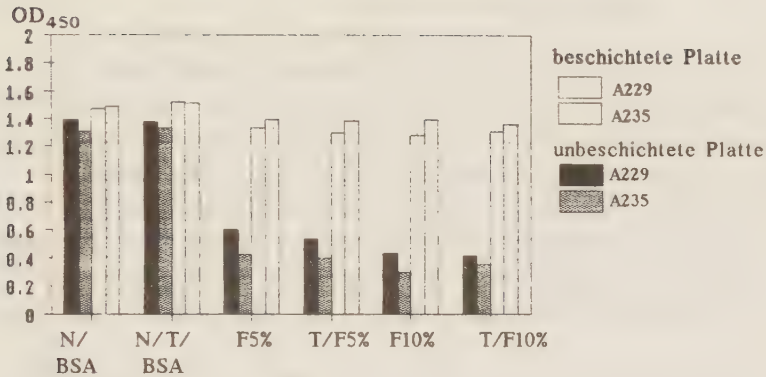


Abbildung 12: Einfluß verschiedener Blockpuffer auf die Bindung von zwei Pferdeseren an die unbeschichtete Platte
 N: NaCl-Phosphatpuffer; T: Tween 20, 0,05%;
 BSA: Bovines Serumalbumin, 0,5%; F: Fetales Kälberserum, 5%/10%;
 Seren: Zwei Pferdeseren, 1:50 im jeweiligen Puffer verdünnt
 Antigen: A/Eq/Miami/1/63(H3N8) 16 HE

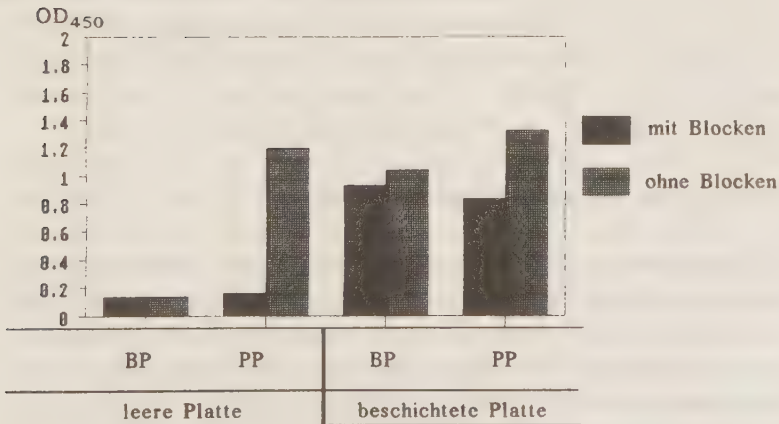


Abbildung 13: Bindung von Antikörpern an die leere und an die mit Antigen beschichtete Platte nach Blocken der Platte und nach Verdünnen eines Miami-positiven Serums in Blockpuffer bzw. NaCl-PP
 BP: Blockpuffer NaCl-PP/10%, FKS /0,5%, Tween 20
 PP: NaCl-Phosphatpuffer
 Antigen: A/Eq/Miami/1/63(H3N8), 16 HE

3.2.5.2. Vergleich von HAH und ELISA

Durch die Beschichtung der Platten mit kompletten Virionen werden vor allem die antigenen Bereiche der Oberflächenproteine und davon besonders das Häm-agglutinin präsentiert. HA-spezifische ELISAs sind also in gewissem Rahmen unter Verwendung von vollständigem Virus möglich. Zur Bestimmung des ELISA-Titers wurde das Serum mit der stärksten Bindung an die leere Platte ermittelt und dessen Extinktion in der Verdünnung 1:100 bestimmt. Das Zweifache dieser Extinktion ($OD_{450} = 0,300$) wurde als Grenzwert verwendet. Als Titer wurde die Verdünnung bezeichnet, bei der dieser Grenzwert noch erreicht wurde.

Die HAH-positiven Seren zeigten bis auf ein Serum auch im ELISA eine positive Reaktion. Von 36 HAH-negativen Seren wurden dagegen acht Seren im ELISA positiv gewertet. Auch innerhalb der Titer wurde eine gute Korrelation zwischen der HAH und dem ELISA gefunden. Der Korrelationskoeffizient wurde mit $R = 0,81$ berechnet. Abb. 14 zeigt die Beziehung zwischen den Titern der HAH und den Titern des ELISAs.

Die in der Praxis verwendeten Vaccinen enthalten im allgemeinen Antigene der beiden Subtypen. Deshalb wiesen die untersuchten Seren oft Titer gegen beide Subtypen auf, so daß Kreuzreaktionen im ELISA zwischen den beiden Subtypen nur wenig in Erscheinung treten. Deshalb war die Frage, ob die im ELISA nachgewiesenen Antikörper subtypspezifisch sind, schwierig zu beantworten. Eine kleine Anzahl von Seren, die einen hohen Unterschied in ihrer Reaktion gegen die beiden Subtypen aufwiesen, wurde daher gesondert untersucht.

3.2.5.3.1. Unterschiedliche Plattenbeschichtungen

Zur Untersuchung der Kreuzreaktionen im ELISA wurden zehn Seren verwendet, von denen drei in HAH und SRH gegen das Antigen A/Eq/Prague/1/56(H7N7) eine positive Reaktion zeigten, sowie sieben Seren, die in HAH und SRH eine positive Reaktion gegen das Antigen A/Eq/Miami/1/63(H3N8) zeigten. Alle Seren wiesen in der HAH und in der SRH niedrige Antikörpertiter gegen das

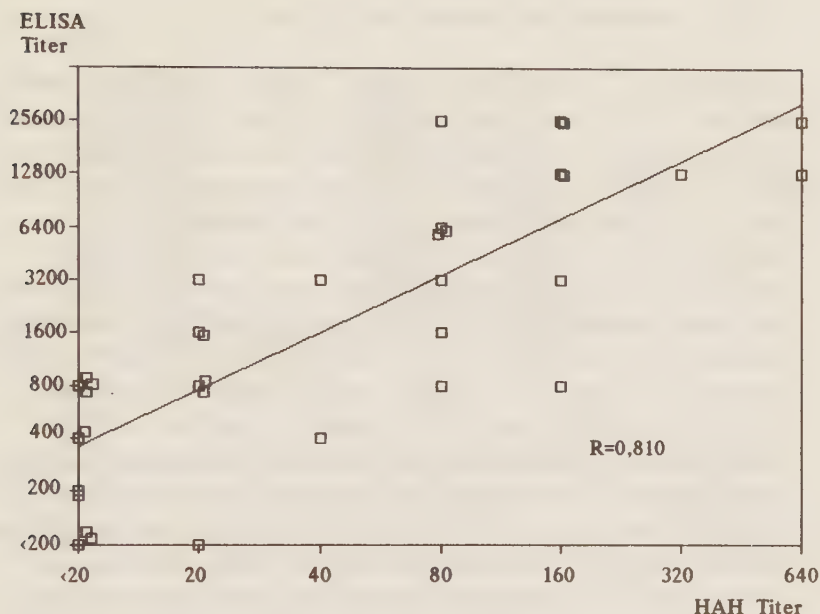


Abbildung 14: Vergleich der ELISA- und HAH-Titer von 36 Pferdeseren
 Antigen: A/Eq/Miami/1/63(H3N8)
 HAH: Seren RDE behandelt, Antigen: 4 HE
 ELISA: Seren 1:100 verdünnt in Blockpuffer, Antigen: 8 HE

heterologe Antigen auf. Gegen die mit komplettem Antigen beschichtete Platte zeigten diese Seren jedoch fast identische Reaktionen gegen die beiden Subtypen. Auf mit Bromelain beschichteten Platten sanken die Titer der Seren gleichmäßig ab. Ein unterschiedliches Bindungsverhalten konnte jedoch nicht beobachtet werden. Die Korrelationen zwischen den Titern von HAH und Bromelain-ELISA bewegten sich im Rahmen von $R=0,072$ und $R=0,1$.

Lubrol ist ein Detergens, das die Oberflächenproteine als Ganzes vom Virus trennt. Der Überstand nach der Zentrifugation des lubrolbehandelten Antigens wurde für die Beschichtung der Platte verwendet. Eine subtypspezifische Bindung konnte hier eher beobachtet werden. Der Vergleich mit den Ergebnissen der HAH zeigte eine deutliche Korrelation von $R=0,843$.

3.2.5.3.2. Unterschiedliche Vorbehandlung der Seren

Wurden die Seren an RNP-Antigen absorbiert, konnte zwischen den Titern der HAH und des ELISAs gegen das Antigen A/Eq/Miami/1/63(H3N8) eine gute Korrelation mit $R = 0,70$ gefunden werden. Die Reaktion gegen das heterologe Antigen A/Eq/Prague/1/56(H7N7) war niedriger als gegen das homologe Antigen, sie blieb jedoch auf einem sehr hohen Niveau bestehen.

Die Seren wurden außerdem durch Inkubation mit dem Antigen A/Swine/Germ/1/(H1N1), das ein von den anderen Antigenen verschiedenes Hämagglutinin trägt, vorbehandelt. Durch die Inkubation wurde die Reaktion der Seren gegen das heterologe Antigen etwas verringert und gegen das homologe Antigen erhöht. Im Vergleich mit der HAH wurde beim Antigen A/Eq/Miami/1/63(H3N8) eine Korrelation von $R = 0,67$ gefunden. Beim Antigen A/Eq/Prague/1/56(H7N7) wurden jedoch weiterhin starke Kreuzreaktionen beobachtet. Wurde das Antigen A/Sw/Germ/1(H1N1) zugegeben, nachdem die Seren verdünnt worden waren, so reagierten die Miami-positiven Seren nur noch schwach gegen das Antigen A/Eq/Prague/1/56(H7N7). Die Prague-positiven Seren zeigten jedoch weiterhin starke Bindung gegen das heterologe Antigen. Dies konnte auch am Korrelationskoeffizienten abgelesen werden. Für A/Eq/Miami/1/63(H3N8) war $R = 0,829$, wohingegen die Titer für A/Eq/Prague/1/56(H7N7) negativ korrelierten ($R = -0,042$).

Der Einfluß einer vorherigen Absorption der Seren an Zellkulturmaterial wurde ebenfalls untersucht. Wie bei der Absorption an irrelevantes Antigen wurde die Absorption in zwei Variationen durchgeführt (Abb. 15). Mit beiden Verfahren wurde jedoch das gleiche Ergebnis erzielt: die Bindung der Seren sank zwar serumspezifisch, eine Beziehung zu den entsprechenden HAH-Titern ließ sich jedoch nicht finden.

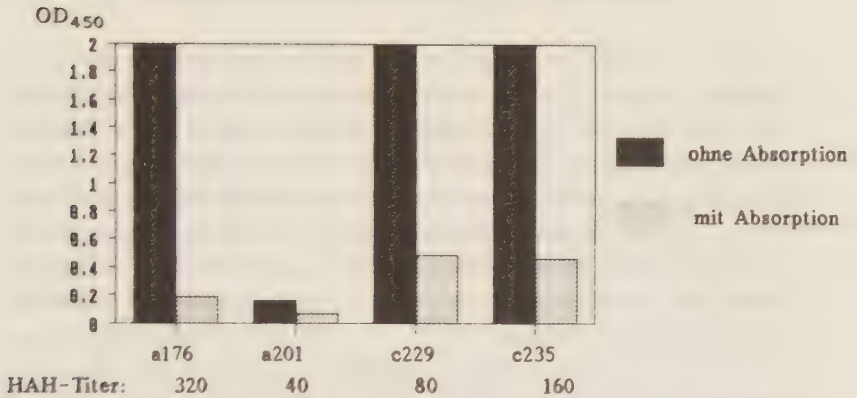


Abbildung 15: Extinktion von vier Pferdeseren im ELISA nach Absorption an Zellkulturmaterial durch Inkubation vor der Verdünnung der Seren 0,5 ml Serum 1:400 + 5µl nichtinfizierter Zellkulturüberstand nach 30 min Inkubation abzentrifugiert
Antigen: A/Eq/Miami/1/63(H3N8) 8 HE

3.2.5.4.1. Reaktion monoklonaler Antikörper im ELISA

Die hämagglutinationshemmenden monoklonalen Antikörper 7/12, 3/1, 3/5 und 8/4 wurden in ihrem Bindungsvermögen an die Antigene A/Eq/Miami/1/63 (H3N8), A/Eq/Kentucky/1/81(H3N8), A/Eq/Fontainebleau/79(H3N8) und A/Eq/Solvalla/79(H3N8) getestet. Der monoklonale Antikörper 7/12, der in der HAH nur gegen A/Eq/Miami/1/63(H3N8) gerichtet ist, zeigte im ELISA eine starke Bindung an das Antigen Miami ($OD_{450} = 1,37$ bei einer Verdünnung des MAK von 1:100). Der Stamm Kentucky wurde in geringem Maße ($OD_{450} = 0,13$ bei Verdünnung des MAK von 1:100) erkannt. Alle anderen Stämme wurden nicht erkannt. Die monoklonalen Antikörper 3/1 und 3/5, die in der HAH eine wesentlich stärkere Hemmung zeigen als 7/12 und gegen fast alle Equi 2 Stämme gerichtet sind, reagierten nur schwach gegen die verwendeten Stämme. Auch der MAK 8/4 zeigte ein sehr schwaches Bindungsvermögen ($OD_{450} < 0,5$ bei Verdünnung der MAK von 1:10) gegen die untersuchten Stämme.

3.2.5.4.2. Kompetitions-ELISA mit monoklonalen Antikörpern

Es wurde untersucht, ob sich die Bindung der Pferdeantikörper an das Häm-agglutinin durch die damit verbundene Verdrängung des MAK 7/12 nachweisen läßt. Zehn Seren wurden in $\log_2$ Schritten verdünnt und der MAK 7/12 in jeweils gleicher Menge zugegeben. Der monoklonale Antikörper wurde mit Biotin gekoppelt und über Strept-Avidin-Peroxidase nachgewiesen, da in einem Vortest die Bindung von Anti-Maus-IgG-Konjugat an die Pferdeseren festgestellt worden war. Als Hemmtiter wurde der reziproke Wert der Serumverdünnung bezeichnet, die die Bindung des MAK 7/12 in der Verdünnung 1:500 ($OD_{450} = 1,3$) um 70% hemmte.

Abb. 16 zeigt die gute Korrelation von Hemmtiter und HAH Titer der zehn getesteten Seren. In keinem Fall wurde eine Differenz von mehr als einer Titerstufe gefunden. Der Korrelationskoeffizient wurde mit $R = 0,9$ berechnet.

ELISA

Hemmtiter

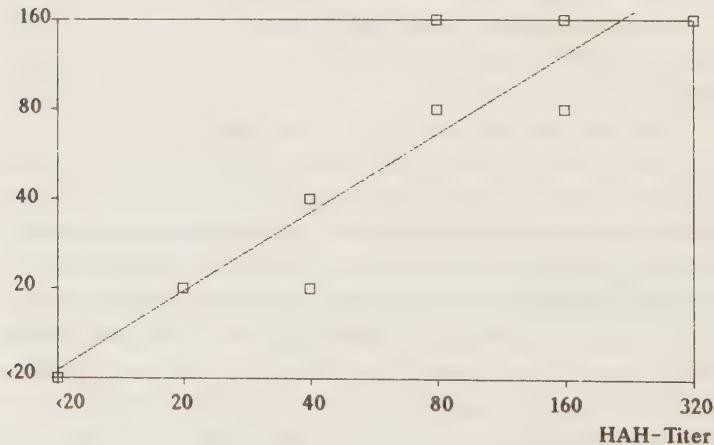


Abbildung 16: Vergleich von HAH-Titer und ELISA-Hemmtiter von acht Pferdeseren

Als Hemmtiter wurde die Serumverdünnung bezeichnet, die eine Hemmung des Kompetitors ($OD_{450} = 1,5$) um 70% bewirkte.

Antigen: A/Eq/Miami/1/63(H3N8); HAH: 4 HE

ELISA: 16 HE

Seren: 1:5 verdünnt in Blockpuffer

Daneben wurde die Regressionsgerade eingezeichnet

3.2.5.4.3. Kompitions-ELISA mit Frettchenseren

Da der einzig geeignete MAK 7/12 eine ausreichend starke Reaktion nur gegen das Antigen A/Eq/Miami/1/63(H3N8) aufwies, um als Kompetitor Verwendung zu finden, wurde versucht, Frettchenseren als Kompetitoren einzusetzen. In einem Kompetitions-ELISA wurde die Hemmung eines biotinmarkierten Frettchenserums gegen A/Eq/Miami/1/63(H3N8) durch Pferdeseren gemessen und der Prozentsatz der Hemmung mit dem HAH-Titer verglichen.

Tab. 8 zeigt eine zwar serumspezifische Verdrängung, die jedoch in keiner Beziehung zum entsprechenden HAH-Titer steht. Eine weitere Untersuchung wurde deshalb nicht durchgeführt.

	Seren						
	B149	A181	B278	B304	B102	A160	210
HAH-Titer:	40	160	0	0	80	20	0
% Hemmung:	50	30	2	90	93	58	24

Tabelle 8: Vergleich der HAH-Titer von 7 Seren mit der Hemmung des Hyperimmunfrettchenserums gegen A/Eq/Miami/1/63(H3N8) durch diese Seren

4. Besprechung der Ergebnisse

Die Influenzavirusstämme A/Eq/Miami/1/63(H3N8), A/Eq/Kentucky/1/81 (H3N8), A/Eq/Fontainebleau/79(H3N8) und A/Eq/Solvala/79(H3N8) konnten an die Zelllinie MDCK adaptiert werden. Die nach 10 Passagen erhaltenen HA-Titer entsprachen den Titern, die auch bei der Vermehrung im embryonierten Hühnerei erhalten wurden. Der Stamm A/Eq/Miami/1/63(H3N8) erreichte mit 256 HE die höchste Konzentration, die anderen Stämme erbrachten Titer zwischen 1:32 und 1:128. Die Virusvermehrung konnte durch das Auftreten eines cpE, durch die Hämaadsorption und durch die Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. Yamagishi et al. (1981) berichten über die Vermehrung beider equiner Subtypen mit und ohne die Zugabe von Trypsin zum Medium. Diese Ergebnisse konnten nicht nachvollzogen werden. Ohne Trypsin wurden mit keiner der Nachweismethoden Anzeichen einer Virusvermehrung gefunden.

Drei Methoden zur Unterdrückung unspezifischer Inhibitoren der HAH wurden untersucht. Dabei wurden zwischen der Behandlung mit RDE und der Behandlung mit Kaliumperjodat fast identische Ergebnisse erzielt. Nur acht Seren differierten hier um eine Titerstufe. Seren, die mit Kaolin vorbehandelt worden waren, zeigten in zwei Fällen Abweichungen von zwei Titerstufen und in 13 bzw. 20 Fällen eine Diskrepanz von einer Titerstufe. Eine Differenz von mehr als 400%, wie sie von verschiedenen Autoren als signifikanter Unterschied in der HAH betrachtet wird, konnte nicht beobachtet werden (Russell et al., 1975; Aymard et al., 1977). Das stärkere Abweichen der kaolinbehandelten Seren läßt sich durch die aufwendigere Technik erklären. Das Kaolin und die Erythrozyten werden als Suspension zu der Serumverdünnung gegeben. Hierbei kann durch Absinken der festen Bestandteile eine unterschiedliche Verdünnung der Seren erfolgen, was schließlich zu Diskrepanzen in der HAH führt.

Die Reinigung von Pferdeantikörpern mit Hilfe der bei anderen Spezies oft verwendeten Affinitätschromatographie an Protein A war nicht möglich. Erst das erweiterte Bindungsvermögen von Protein-G ermöglichte die Herstellung einer gereinigten IgG-Präparation. Mit Hilfe dieser IgG-Präparation konnten erstmals die verschiedenen Vorbehandlungen der Seren auf die vollständige Befreiung von Inhibitoren untersucht werden. Der Vergleich der erhaltenen Titer von Protein G gereinigten Seren mit den Titern der anderen Verfahren

zeigte, daß die verwendeten Verfahren durchaus alle Inhibitoren beseitigen. Obwohl die Unterschiede in sechs bzw. zwei Fällen zwei Titerstufen betrugen, wurde eine signifikante Abweichung von mehr als 400% nicht beobachtet. Die Unterschiede mit den Werten der SRH, die von Schild et al. (1975) auf die unzureichende Zerstörung der Inhibitoren durch RDE zurückgeführt wurden, müssen deshalb anderen Faktoren angelastet werden.

Die SRH wurde auf verschiedene Parameter hin untersucht.

Die Qualität der Hämolyse war stark vom HA-Titer des verwendeten Antigens abhängig. Unter 128 HE wurden nur bei einigen Stämmen klare und scharf begrenzte Hämolysen beobachtet, die eine deutliche Unterscheidung zwischen totaler und partieller Hämolyse zuließen. Über 128 HE wurden in allen Fällen klare Hämolysen gefunden. Dies steht im Einklang mit Untersuchungen von Schild et al. (1975), die unter einem HA-Titer von 1:100 partielle Hämolysen beobachten.

Zwischen der Konzentration des Antigens und der Größe der Hämolysen konnte eine eindeutig negative Beziehung gefunden werden. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen von Schild et al. (1975) und Russell et al. (1975). Sie läßt sich auf die größere Zahl von Virionen pro Erythrozyt bei hoher Antigenkonzentration zurückführen. Dadurch lagern sich die im Serum enthaltenen Antikörper während der Diffusion quantitativ schon innerhalb einer kürzeren Wegstrecke an das Antigen an.

Die SRH konnte frühestens nach zehn Stunden abgelesen werden. Zwar waren die Hämolysen bereits nach 2-3 Stunden voll ausgebildet, die maximale Ausdehnung der Hämolyseflächen von stark positiven Seren wurde jedoch erst nach 8-10 Stunden erreicht. Eine frühere Ablesung der Ergebnisse, wie sie von Aymard (1977) vorgeschlagen wird, kann deshalb zu einer Unterbewertung stark positiver Seren führen, die ihre volle Ausbreitung im Agarosegel dann noch nicht erreicht haben.

Das Erscheinungsbild der Hämolysen ist vielfältig. Hämolytische Seren können durch ihre Eigenfarbe kleine Hämolysen überdecken. Daneben müssen partielle Hämolysen von klaren Hämolysen unterschieden werden. Doppelzonen sind als gleichzeitiges Auftreten von partiellen und totalen Hämolysen zu verstehen. Schild et al. (1975) führen diese partielle Hämolysen auf Anti-Neuraminidase-Antikörper und auf kreuzreagierende Antikörper zurück. Partielle Hämolysen

wurden sowohl bei Pferdeseren wie auch bei Fretchenseren und den monoklonalen Antikörpern gefunden. Ihr Erscheinen beschränkte sich nicht auf heterologes Antigen, sondern wurde auch gegen das homologe Antigen ausgebildet. Ihr Erscheinen bei Pferdeseren könnte sich auf die Anwesenheit von Anti-Neuraminidaseantikörper zurückführen lassen. Für die partiellen Hämolysen, die durch monoklonale Antikörper hervorgerufen wurden, müssen jedoch andere Mechanismen verantwortlich gemacht werden.

Für die Relation von SRH-Durchmessern und HAH-Titer gibt es sehr unterschiedliche Angaben; die meisten Autoren finden jedoch eine Beziehung zwischen den logarithmierten Werten der HAH-Titer und der Hämolyseflächen (Schild et al., 1975; Russell et al., 1975; Mentel et al., 1978). Wir fanden die beste Korrelation zwischen den Durchmessern der Hämolyseflächen und den Titerstufen. Die Verwendung der Durchmesser als Maß für die Antikörperkonzentration erlaubt darüberhinaus eine rasche Orientierung ohne vorherige Berechnung der Flächen.

Ein Maß für die Vertrauenswürdigkeit eines Testes sind die Abweichungen der Ergebnisse wiederholter Messungen. Die Variation gleicher Seren innerhalb einer Platte wurde unter 4,2% gefunden; die Variation zwischen Platten betrug unter 9,1% und zwischen Tests durchschnittlich 4,47% mit einer maximalen Variation von 15,4%. Plateau et al. (1983) berichten von max. 4,2 % Variation der Durchmesser, wobei die Untersuchung jedoch lediglich mit einem Serum in verschiedenen Verdünnungen durchgeführt wurde. Russell et al. (1975) finden, hier allerdings zwischen Flächen, Abweichungen innerhalb von Platten von 2%, zwischen Platten von 3% und zwischen Tests unter 13%. Aymard (1977) schließlich findet zwischen wiederholten Tests Variationen der Durchmesser unter 13%. Eine Änderung des Durchmessers von 15% entspricht einer Änderung des Antikörpertiters um 200%. Werden, wie in dieser Arbeit alle Seren am gleichen Tag getestet, so kann ein Unterschied des Durchmessers von mehr als 10% als signifikant betrachtet werden. Dies entspricht einer Änderung des HAH-Titers um 50% und liegt damit weit unter dem für die HAH als signifikant betrachteten Wert von 400%.

Noe (1986) fand für die monoklonalen Antikörper 7/12, 3/1 und 8/4 ein bestimmtes Reaktionsmuster in der HAH gegen die hier verwendeten Antigene. Während der MAK 7/12 nur gegen den Stamm A/Eq/Miami/1/63(H3N8) reagierte, erreichten die MAK 3/1 und 8/4 hohe HAH-Titer gegen alle geteste-

ten Antigene. Dieses Muster wurde auch in der SRH beobachtet. Zusätzlich zeigte der MAK 7/12 eine sehr schwache, partielle Hämolyse gegen das Antigen A/Eq/Kentucky/1/81(H3N8). Diese Kreuzreaktion könnte einer von verschiedenen Autoren gefundenen höheren Sensitivität der SRH zugesprochen werden. In dieser Arbeit wurde jedoch eine höhere Sensitivität für die Pferdeseren nicht beobachtet. Ebenfalls getestet wurden die neuraminidasehemmenden monoklonalen Antikörper 2/1 und 4/2. Obwohl der Nachweis von Anti-Neuraminidase-Antikörpern in der SRH durchaus möglich ist, wie die Vielzahl der partiellen Hämolysen zeigt, wurde eine Reaktion selbst mit unverdünnter Ascitesflüssigkeit nicht beobachtet.

Auch im Vergleich mit Frettchenseren wurde eine höhere Spezifität, wie sie von Russell et al. (1975) beobachtet wird, nicht gesehen. Die Frettchenseren reagierten auch gegen in der HAH nicht erkannte Stämme mit partiellen und zum Teil klaren Hämolysen. Ein unterschiedliches Verhalten von Frettchenseren in SRH und HAH gegenüber verschiedenen Stämmen finden Smith et al. (1986). Neben Korrelationen von $R = 0,9$ wird gegen einen zweiten Stamm eine Korrelation von $R = 0,45$ gefunden. Der direkte Vergleich von HAH und SRH mit 120 bzw. 160 Pferdeseren, die von Pferden unterschiedlichsten Alters, Rasse und Impfvorgeschichte stammen, zeigt eine gute Korrelation der beiden Tests. Besonders geeignet ist die SRH zur Untersuchung großer Probenzahlen. Die Seren können ohne Vorbehandlung und unverdünnt verwendet werden und es werden mit 5 μ l nur sehr geringe Mengen davon benötigt. Es hat sich gezeigt, daß ungereinigtes Antigen aus Allantoisflüssigkeit oder Zellkulturüberstand nicht geeignet ist. Die von humanen Influenzastämmen erreichten Titer werden von equinem Influenzavirus nicht erreicht. Aus diesem Grund ist die Verwendung von konzentriertem Antigen mit mindestens 256 HE notwendig. Dies stellt jedoch im Vergleich zur HAH keinen Nachteil dar, da hier ebenfalls kein ungereinigtes Antigen verwendet wird. Die Gesamtmenge an Antigen, die für die SRH benötigt wird, ist jedoch weit höher als für die HAH. Während für die HAH pro Serum etwa 200 μ l Antigen mit 4 HE benötigt werden, sind für die SRH etwa 120 μ l Antigen von 256 HE einzurechnen. Die SRH ist für die Untersuchung einzelner Proben nicht geeignet. Die Herstellung der Platten ist zeitlich aufwendig und vorbereitete Platten können

nicht über längere Zeit gelagert werden. Hierzu scheint die HAH weitaus besser geeignet zu sein, obwohl auch hier Vortests zum Einstellen des Antigens durchgeführt werden müssen. Bei der Untersuchung einer großen Zahl von Proben ist die SRH jedoch überlegen.

Die Verwendung eines ELISAs zum Nachweis von Antikörpern gegen equine Influenzaviren wäre aus verschiedenen Gesichtspunkten zu begrüßen. Die für die Durchführung des ELISAs gebrauchten Substanzen sind länger haltbar als Hühner- und Schaferythrozyten und sind nicht in so hohem Maße Schwankungen ausgesetzt, wie dies biologische Substanzen sind. Darüberhinaus besitzt der ELISA als Nachweis der primären Bindung von Antikörpern im Allgemeinen eine wesentlich höhere Sensitivität (Tizard, 1982).

Der ELISA mit Verwendung von komplettem Virus als Plattenbeschichtung erbrachte eine gute Korrelation mit den HAH-Titern. Dies wird von anderen Autoren ebenfalls beschrieben (Labre und Kasturi, 1979; Khristova et al., 1988). Die außergewöhnlich starke Bindung von einzelnen Pferdeseren an Kunststoffe und Proteine machte jedoch die Verwendung eines Blockpuffers mit hohem Serumgehalt zur Absorption dieser Antikörper notwendig.

Darüber hinaus wurden bei einigen Seren starke Kreuzreaktionen gegen heterologes Virus beobachtet. Zur Eliminierung dieser Kreuzreaktionen wurde von verschiedenen Autoren die Verwendung gereinigten Hämagglutinins zur Beschichtung der Platten vorgeschlagen (Murphy et al., 1981; Khristova et al., 1988; Julkunen et al., 1985; Burlington et al., 1983), bzw. die Absorption der Seren an ein Antigen mit differierendem Hämagglutinin (Denyer et al., 1984). Es wurde deshalb versucht, diese Kreuzreaktionen durch verschiedene Maßnahmen zu unterdrücken.

Die Absorption der Seren erbrachte im allgemeinen eine zu geringe Reduktion. Durch die Absorption der Seren mit RNP-Antigen konnte die Reaktion an das heterologe Antigen nur wenig verringert werden. Die Absorption mit Zellkulturmaterial erbrachte zwar eine starke Reduktion der Antikörperbindung, die im ELISA erhaltenen Titer entsprachen jedoch nicht den HAH-Titern. Bei der Absorption der Seren an ein Antigen mit irrelevantem Hämagglutinin (H1N1) konnte ebenfalls eine subtypspezifische Reduktion der Bindung an das heterologe Antigen beobachtet werden, der Unterschied zwischen homologem und hetero-

logem Antigen blieb jedoch auch hier sehr gering.

Eine Aufreinigung des Antigens ist durch enzymatische Spaltung des Hämagglutinins und durch Lösung des Hämagglutinins mit Detergentien möglich.

Wurde der Überstand von mit Bromelain behandeltem Virus zur Beschichtung der Platten verwendet, so reagierten die Seren nur schwach und undifferenziert.

Eine weitere Reinigung dieses Überstandes, wie dies verschiedene Autoren beschreiben, könnte hier das Ergebnis verbessern (s.o.). Die Reaktion gegen das mit Lubrol behandelte Antigen zeigte eine gute Korrelation, die jedoch im Hinblick auf die geringe Zahl von Proben vorsichtig bewertet werden muß. Zudem lag auch hier die Reaktion der heterologen Seren noch sehr hoch.

Der unerwünschte Nachweis kreuzreagierender Antikörper läßt sich durch die Verwendung eines Kompetitions-ELISAs mit monoklonalen Antikörpern umgehen. Ein solcher MAK mit ausreichend starkem Bindungsvermögen stand jedoch nur für den Stamm A/Eq/Miami/1/63(H3N8) zur Verfügung. Durch Verwendung dieses MAK als Kompetitor konnte eine sehr gute Korrelation mit den Titern der HAH erreicht werden. Da monoklonale Antikörper nur an ein Epitop binden, werden somit im Kompetitions-ELISA nur Antikörper erfaßt, die gegen dieses Epitop binden. Eine gute Übereinstimmung von HAH- und ELISA-Titer ist also nur dann möglich, wenn der MAK ein für die Hemmung des Hämagglutinins wichtiges Epitop erkennt und wenn die Bildung der Antikörper zu etwa gleichen Teilen gegen alle Epitope erfolgt.

Desweiteren wurde die Verwendung von biotinylierten Frettschenseren als Kompetitoren im Kompetitions-ELISA untersucht. Es konnte zwar eine unterschiedliche Hemmung durch die Seren festgestellt werden, im Vergleich mit der HAH ergaben sich jedoch starke Unterschiede der Titer. Möglicherweise ist die Ursache für diese Differenzen in der Bindung der Frettschenantikörper gegen RNP-Antigen zu suchen, welches bei der Verwendung kompletten Antigens zur Beschichtung der Platten freigelegt wird.

5. Zusammenfassung

Verschiedene Nachweisverfahren für Antikörper gegen equine Influenzaviren wurden untersucht. Dazu wurden Pferdeseren mit RDE, Kaliumperjodat und Kaolin zur Entfernung unspezifischer Inhibitoren behandelt. Die Titer der so behandelten Seren wurden im Hämagglutinationshemmungstest mit den Titern von Seren verglichen, die durch Protein-G Sepharose gereinigt waren. Alle Verfahren unterdrückten die inhibitorische Aktivität der Seren in der gleichen Größenordnung wie die Reinigung durch Protein-G.

Die Radiale Gelhämolysen wurde auf verschiedene Parameter hin untersucht. Dabei wurde der Einfluß der Antigenkonzentration auf Qualität und Größe der Hämolysenhöfe und die Wiederholgenauigkeit der SRH bestimmt. Die Variation der Ergebnisse gleicher Seren innerhalb von Platten wurde mit max. 4,2% berechnet, die maximale Variation zwischen Platten mit 9,3% und die maximale Variation zwischen Tests an verschiedenen Tagen mit 15,7%. Als signifikant wurde eine Abweichung der Durchmesser von mehr als einem Millimeter gefunden. Daneben wurden die Durchmesser der Hämolysenhöfe von 120 Serumproben mit den HAH-Titern der Proben verglichen. Hier ergaben sich Korrelationen zwischen $R=0,79$ und $R=0,88$. Die SRH wurde als besonders geeignet für die Untersuchung einer größeren Anzahl von Proben gefunden, da die Vorbehandlung der Seren zur Entfernung von Inhibitoren der Hämagglutination entfällt. Eine höhere Empfindlichkeit der SRH im Vergleich zur HAH wurde nicht gesehen.

Die Verwendung des ELISAs zum Nachweis von Antikörpern wurde ebenfalls untersucht. Bei der Beschichtung der Platten mit komplettem Virus konnte bei den Stämmen des Subtyps Equi 2 eine Korrelation mit den HAH-Titern von $R=0,80$ festgestellt werden. Die Reaktionen einzelner Seren wurden jedoch von starken Kreuzreaktionen geprägt. Versuche, diese Kreuzreaktionen durch Absorption der Seren mit einem irrelevanten Antigen, mit RNP Antigen und durch die Beschichtung der Platten mit teilweise gereinigtem Hämagglutinin einzudämmen, gelangen nur begrenzt. Als geeignet wurde der Nachweis über die Hemmung eines gegen den Stamm Miami gerichteten monoklonalen Antikörpers gefunden. Die hier bestimmten Titer korrelierten mit den HAH-Titern sehr gut ($R=0,90$).

5. Summary

Comparative investigations of serological assays to detect antibodies against equine influenza viruses

Different methods for measuring antibodies against equine influenza viruses were compared. Horse sera were treated with RDE, potassium periodate and kaolin to inactivate nonspecific inhibitors. Titers of these sera in the hemagglutination inhibition test were compared with titers of sera purified by affinity chromatography on protein-G sepharose. All treatments reduced the inhibitory activity of the sera to levels of sera purified by protein G.

Different parameters were examined in Single Radial Hemolysis. The influence of antigen concentration on the quality and size of hemolytic zones as well as the degree of accuracy in repeated tests was examined. The intra-plate variation was found to be maximally 4.5%, inter-plate variation maximally 9.3% and inter-assay variation maximally 15.7%. A difference of one millimeter in the diameter of the hemolytic zones was found to be significant. The diameters of the hemolytic zones of 120 sera were compared with the HI-titers of the same sera. Correlations between $R = 0.79$ and $R = 0.88$ were determined. SRH was not more sensitive than HI.

SRH proved to be very suitable for assessing large numbers of sera since the sera do not have to be treated to reduce nonspecific inhibitors.

Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay was also tested. When plates were coated with whole virus, a correlation with HI-titers of $R = 0.80$ was found for subtype 2 strains. However cross-reactions were observed in some sera.

Absorption of sera to irrelevant antigen, with RNP-antigen and the use of plates coated with partially purified hemagglutinin was not successful. A competition assay with a monoclonal antibody against strain A/Equ/Miami/1/63 (H3N8) was found to be very suitable. A good correlation ($R = 0.9$) with the HI-titers was found.

7. Literaturverzeichnis

- Air, G.M., M.C. Els, L.E. Brown, W.G. Laver, R.G. Webster, 1985:
Location of antigenic sites on the three-dimensional structure of the
influenza N2 virus neuraminidase.
Virology 145, 237-248
- Air, G.M., W.G. Laver, R.G. Webster, 1987:
Antigenic variation in influenza viruses.
Contr. Microbiol. Immunol. 8, 20-59
- Akkina, R.K., D.P. Nayak, 1987:
Interference by defective interfering influenza virus: role of defective
viral polypeptides in infected cells.
In: The biology of negative strand viruses,
Mahy, B., D. Kolakofsky, (eds.) Elsevier, New York, 183-190
- Anonym, 1980:
A revision of the system of nomenclature for influenza viruses: a
WHO memorandum.
Bull. World Health Org. 58, 585-591
- Anonym, 1982:
Concepts and procedures for laboratory-based influenza surveillance
U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, London
- Appleyard, G., H.B. Maber, 1974:
Plaque formation by influenza viruses in the presence of trypsin.
J. Gen. Virol. 25, 351-357
- Aymard, M., 1977:
Comparison of immunological methods in the diagnosis of influenza.
Bulletin de L'Institut Pasteur 75, 309-321

Aymard-Henry, M., M.T. Coleman, W.R. Dowdle, W.G. Laver, G.C. Schild, R.G. Webster, 1973:

Influenzavirus neuraminidase and neuraminidase-inhibition test procedures.

Bull. Wld. Hlth. Org. 48, 199-202

Bachi, T., W. Gerhard, J.W. Yewdell, 1985:

Monoclonal antibodies detect different forms of influenza virus hemagglutinin during viral penetration and biosynthesis.

J. Virol. 55, 307-313

Barett, T., S.C. Inglis, 1982:

In: Virology: a practical approach

Mahy, B.W.J., (ed.), JRL Press, Oxford

Bishai, F.R., R. Galli, 1978:

Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to influenza A and B and Parainfluenza Type 1 in sera of patients.

J. Clin. Microbiol. 8, 648-656

Brand, C.M., J.J. Skehel, 1972:

Crystalline antigen from the influenza virus envelope.

Nature New Biology 238, 145-147

Brion, A., C. Cateigne, M.P. Fontaine, R. Moraillon, 1966:

Grippe equine - charakterisation de virus grippaux isoles en 1965.

Bull. Acad. Vet. 34, 155

Burlington, D.B., M.L. Clements, G. Meiklejohn, M. Phelan, B.R. Murphy, 1983:

Hemagglutinin-specific antibody responses in immunoglobulin G, A and M isotypes as measured by enzyme-linked immunosorbent assay after primary or secondary infection of humans with influenza A virus.

Infect. Immun. 41, 540-545

Burnet, F.M., J.D. Stone, 1947:

The receptor destroying enzyme of *V. cholerae*.

Aust. J. exp. Biol. med. Sci. 25, 227-233

Came, P.E., A. Pascale, G. Shimonaski, 1968:

Effect of pancreatin on plaque formation by influenza viruses.

Arch. ges. Virusforsch. 23, 346-352

Chen, H.C., 1987:

Nachweis von bovinem Coronavirus - Antigen mittels Elisa und vergleichende Untersuchungen mit anderen Nachweisverfahren.

Vet. Med. Diss., München

Ching-Juh, L., L.J. Markoff, M. Sveda, R. Dhar, R.M. Chanock, 1980:

DNA sequences derived from genomic and mRNA species that code for the hemagglutinin and the neuraminidase of influenza A virus.

In: Structure and variation in influenza virus

Laver, G., G. Air, (eds.) Elsevier, New York, 115-124

Chu, C.M., 1951:

The action of normal mouse serum on Influenza virus.

J. gen. Microbiol. 5, 739-757

Colman, P.M., J.N. Varghese, W.G. Laver, 1983:

Structure of the catalytic and antigenic sites in influenza virus neuraminidase.

Nature 303, 41-44

Cook, R.F., R. Sinclair, J.A. Mumford, 1988:

Detection of influenza nucleoprotein antigen in nasal secretions from horses infected with A/equine influenza (H3N8) viruses.

J. virol. Meth. 20, 1-9

Daniels, R.S., 1983:

Studies of the Influenza Virus Haemagglutinin in the pH5 Conformation.

In: The origin of pandemic influenza viruses,

Laver, W.G. (ed.), Elsevier, New York, 1-8

Denyer, M.S., J.R. Crowther, 1986:

Use of indirekt and competitive ELISAs to compare isolates of equine influenza A virus.

J. Virol. Meth. 14, 253-265

Denyer, M.S., J.R. Crowther, R.C. Wardley, R. Burrows, 1984:

Development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of specific antibodies against an H7N7 and an H3N8 equine influenza virus.

J. Hyg. Camb. 93, 609-620

Döller, P.C., G. Döller, H.-J. Gerth, 1987:

Subtype-specific identification of influenza virus in cell cultures with FITC labeled egg yolk antibodies.

Med. Microbiol. Immunol. 176, 27-35

Edward, D.G., 1941:

Resistance of influenza viruses to drying and its demonstration on dust.

Lancet , 664-666

Edward, D.G., D. Lush, R.B. Bourdillon, 1943:

Studies on air-borne virus infection. 2. The killing of virus aerosols by ultraviolet radiation.

J. Hyg. 43, 11-15

Fields, S., G. Winter, G.G. Brownlee, 1981:

Structure of the neuraminidase in human influenza virus A/PR/8/34.

Nature 290, 213-217

Francis, T., 1947:

Dissociation of haemagglutinating and antibody measuring capacities of influenza virus.

J. exp. Med. 85, 1-7

Francis, T., T.P. Magill, 1937:

Direct transmission of human influenza virus to mice.

Proc. Soc. exp. Biol. 36, 132-133

Friedewald, W.F., E.W. Hook, 1948:

Influenza virus infection in the hamster. A study of inapparent infection and virus adaptation.

J. exp. Med. 88, 343-353

Fulton, R.E., P.J. Middleton, 1974:

Enzyme immunoassay for direct detection of influenza type A and adenovirus antigens in clinical specimens.

J. Clin. Microbiol. 10, 92-101

Garin, B., E. Plateau, S. Gillet-Forin, 1986:

Serological diagnosis of influenza A infections in the horse by enzyme immunoassay. Comparison with the complement fixation test.

Vet. Immunol. Immunopath. 13, 357-363

Garten, W., D. Linder, R. Rott, H.-D. Klenk, 1982:

The cleavage site of the hemagglutinin of fowl plague virus.

Virology 122, 186-190

Gaush, C.R., T.F. Smith, 1964:

Replication and plaque assay of influenza virus in an established line of canine kidney cells.

Appl. Microbiol. 16, 588-594

Gething, M.J., J.M. White, M.D. Waterfield, 1978:

Purification of the fusion protein of Sendai virus. Analysis of the NH₂-terminal sequence generated during precursor activation.
Proc. natl. Acad. Sci. U.S.A. 75, 2737-2740

Gibson, C.A., J.M. Wood, J. Mimford, G.C. Schild, A.M. Bevan, 1985:

A single-radial haemolysis technique for measurement of antibody to influenza virus neuraminidase in equine sera.
J. Virol. Meth. 11, 299-308

Goodeve, A.C., R. Jennings, C.W. Potter, 1983:

The use of the single radial haemolysis test for assessing antibody response and protective antibody levels in an influenza B vaccine study.
J. biol. Stand. 11, 289-296

Gottschalk, A., 1958:

The influenza virus neuraminidase.
Nature 181, 377-378

Guss, B., M. Eliasson, A. Olsson, M. Uhlen, A.K. Frej, H. Jörnvall, J.I. Flock, M. Lindberg, 1986:

Structure of the IgG-binding regions of streptococcal Protein G.
EMBO 5, 1567-1575

Harmon, M.W., K.M. Pawlik, 1982:

Enzyme Immunoassay for direct detection of influenza type A and adenovirus antigens in clinical specimens.
J. Clin. Microbiol. 15, 5-11

Hinshaw, V.S., C.W. Naeve, R.G. Webster, A. Douglas, J.J. Skehel, J. Bryans, 1983:

Analysis of antigenic variation in equine 2 viruses.
Bull. Wld. Hlth. Org. 61, 153

Hirst, G.K., 1941:

Agglutination of red cells by allantoic fluid of chick embryos infected with influenza virus.

Science 94, 22-23

Hirst, G.K., 1949:

Effekt of sodium periodate on the elution of influenza virus from red cells.

J. exp. Med. 89, 223-232

Horsfall, F.L., 1955:

Reproduktion of influenza viruses. Quantitative investigations with particle enumeration procedures on the dynamics of the influenza A and B virus reproduction.

J. exp. Med. 102, 441-473

Hotchin, J.E., R. Deibel, L.M. Benson, 1960:

Loation of noncytopathic myxovirus plaques by haemadsorption.

Virology 10, 275-280

Huang, R.T.C., R. Rott, K. Wahn, H.-D. Klenk, T. Kohama, 1980:

The function of the neuraminidase in membrane fusion induced by myxoviruses.

Virology 107, 313-319

Huang, R.T.C., K. Wahn, H.D. Klenk, R. Rott, 1980:

Fusion between cell membrane and liposomes containing the glycoproteins of influenza virus.

Virology 104, 294-302

Jackson, R.C., J.M. Murray, E.M. Anders, D.O. White, R.G. Webster, L.E. Brown, 1983:

Expression of a unique antigenic determinant of influenza virus hemagglutinin at pH5.

In: The origin of pandemic influenza viruses,

Laver, W.G. (ed.), Elsevier, New York, 29-38

Johansson, M.E., M. Grandien, L. Arro, 1979:

Preparation of sera for subtyping of influenza A viruses by immunofluorescence.

J. Immunol. Meth. 27, 263-272

John, T.J., V.A. Fulginiti, 1966:

Parainfluenza 2 virus: increase in hemagglutinin titer on treatment with Tween 80 and ether.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 121, 109-111

Johnstone, A., R. Thorpe, 1982:

Immunochemistry in practice.

Blackwell Scientific Publications, Oxford London Edinbourg

Julkunen, I., M. Kleemolka, T. Hovi, 1984:

Serological diagnosis of Influenza A and B infections by enzyme immunoassay, comparison with the complement fixation test.

J. virol. Meth. 9, 7-14

Julkunen, I., R. Pyhälä, T. Hovi, 1985:

Enzyme immunoassay, complement fixation and hemagglutination inhibition tests in the diagnosis of Influenza A and B virus infections, purified hemagglutinin in subtype-specific diagnosis.

J. virol. Meth. 10, 75-84

Khristova, M.L., E.M. Egorenkova, T.L. Busse, S.V. Leonov, S.A. Demidova,

I.G. Kharintonenkov, 1988:

Simultaneous determination of the level of antibodies to influenza virus surface and internal proteins by enzyme-linked immuno sorbent assay.

Acta virol. 32, 109-116

Klenk, H.D., 1980:

Processing of the hemagglutinin: glycosylation and proteolytic cleavage.

In: Structure and variation in influenza virus

Laver, G., G. Air, (eds.) Elsevier, New York, 213-222

Krug, R.M., 1983:

Transcription and replication of influenza viruses.

in: Palese, Kingsbury, Genetics of influenza viruses,

Springer, Wien, 70-98

Lamb, R.A., 1983:

The influenza RNA segments and their encoded proteins.

in: Palese, Kingsbury, Genetics of influenza viruses, Springer, Wien, 21-69

Lambre, C., K.N. Kasturi, 1979:

A microplate immunoenzyme assay for anti-influenza antibodies.

J. Immun. Meth. 26, 61-67

Loosli, G.C., M.H. Lemon, O.H. Robertson, E. Appel, 1943:

Experimental air-borne influenza infection. 1. Influence of humidity on survival of virus in air..

Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 53, 205-206

Luther, P., B. Adameczyk, K.-Ch. Bergmann, 1980:

Simple test for detection of virus neuraminidase and anti-neuraminidase using lectins (Lectin-neuraminidase test system).

Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. 248, 281-285

Mayr, A., P.A. Bachmann, B. Bibrack, G. Wittmann, 1974:

Virologische Arbeitsmethoden. Bd. 2 : Serologie.

VEB Gustav Fischer Verlag, Jena

Mentel, R., R. Herrmann, L. Döhner, 1978:

Einsatz der Radialhämolysen bei der Diagnostik von Influenzavirusinfektionen.

Arch. exper. Vet. med. 32, 519-523

Murphy, B.R., E.L. Tierney, B.A. Barbour, R.E. Mayner, R.M. Chanock, 1980:

Use of enzyme-linked immunosorbent assay to detect serum antibody responses of volunteers who received attenuated influenza A virus vaccines.

Infect. 29, 342-347

Murphy, B.R., M.A. Phelan, D.L. Nelson, R. Yarchoan, E.L. Tierney, D.W.

Alling, R.M. Chanock, 1981:

Hemagglutinin-specific enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to influenza A and B viruses.

J. Clin. Microbiol. 13, 554-560

Murti, K.G., R.G. Webster, 1985:

Distribution of hemagglutinin and neuraminidase on influenza virions as revealed by immuno-electron microscopy.

Virology, (in press, 1985)

Nilson, B., B. Akerstrom, L. Löfdberg, 1987:

Cross-reacting monoclonal anti-a1-microglobulin antibodies produced by multi-species immunization and using Protein G for the screening assay.

J. Immun. Meth. 99, 39-45

Noe, T., 1986:

Charakterisierung und Differenzierung von equinen Influenza A Viren (H3N8) mit monoklonalen Antikörpern.

Diss. Med. vet. München

Palmer, P., W.R. Dowdle, M.T. Coleman, G.C. Schild, 1975:

Advanced laboratory techniques for influenza diagnosis.

U.S. Departement of Health, Education and Welfare

Immunology Series No. 6

Peters, J.H., H. Baumgarten, M. Schulze, 1985:

Monoklonale Antikörper: Herstellung und Charakterisierung.

Springer Verlag, Berlin

Plateau, E., C. Cruciere, 1983:

Study on radial hemolysis method for detection of anti influenza equi
antibodies in equine sera: reliability and expression of the results.

Zbl. Vet. Med. B 30, 512-520

Robertson, J.S., C.W. Naeve, R.G. Webster, J.S. Bootman, R. Newman, G.C.

Schild, 1985:

Alterations in the hemagglutinin associated with adaption of influenza
B virus to growth in eggs.

Virology 143, 166-174

Robertson, J.S., J.S. Bootman, J.S. Oxford, R. Newman, C.W. Naeve, R.G.

Webster, G.C. Schild, 1987:

Characterization of egg-adapted variants of human influenza viruses.

In: The biology of negative strand viruses, Mahy, B., D. Kolakofsky,
(eds.) Elsevier, New York, 412-416

Rott, R., 1980:

Studies on structure - function relationships of influenza virus
glycoproteins.

In: Structure and variation in influenza virus

Laver, G., G. Air, (eds.) Elsevier, New York, 201-212

Russell, S.M., D. McCahon, A.S. Beare, 1975:

A single radial haemolysis technique for the measurement of influenza antibodies.

J. gen. Virol. 27, 1-10

Sampaio, A.A.C., A. Isaacs, 1953:

The action of trypsin on normal serum inhibitors of Influenza virus haemagglutination.

Brit. J. exp. Path. 34, 152-158

Schild, G.C., M.S. Pereira, P. Chakraverty, 1975:

Single-radial-haemolysis: a new method for the assay of antibody to influenza haemagglutinin.

Bull. World Health Organ. 52, 43-50

Schild, G.C., M. Henry-Aymard, H.G. Pereira, 1972:

A quantitative, single-radial-diffusion test for immunological studies with influenza virus.

J. gen. Virol. 16, 231-236

Schild, G.C., H.G. Pereira, D. Rothwell, I.L. Berryman, 1973:

Quantitative single-radial-immunodiffusion tests for immunological studies with influenza viruses-potential applications for antibody and antigen assays in vaccine standardization and influenza diagnosis.

Proceedings: Intern. Conference Standard of Diagn 0, 243-258

Schild, G.C., J.S. Oxford, J.C. Jong, R.G. Webster., 1983:

Evidence for host-cell selection of influenza virus antigenic variants.

Nature 303, 706-709

Schmidt, N.J., M. Ota, D. Gallo, V.L. Fox, 1982:

Monoclonal antibodies for rapid, strain-specific identification of Influenza virus isolates.

J. Clin. Microbiol. 16, 763-765

Scholtissek, C., W. Rhode, E. Harms, R. Rott, 1977:

Correlation between base sequence homology of RNA segment 4 and antigenicity of the hemagglutinin of influenza viruses.

Virology 79, 330-336

Smith, W., C.H. Andrewes, P.P. Laidlaw, 1933:

A virus obtained from influenza patients.

Lancet , 66-68

Smith, T.L., R. Jennings, C.W. Potter, 1987:

Use of single radial haemolysis for assessing antibody response to influenza virus vaccines in animals.

Med. Microbiol. Immunol. 176, 329-339

Stakhanova, V.M., 1958:

Different sensitivity of human and chicken erythrocytes to the action of non-specific inhibitors of haemagglutination.

Vop. Virus. 5, 77-80

Tateno, E.I., M. Makino, Y. Takeuchi, 1966:

Rapid diagnosis of influenza B with fluorescent antibody.

Japan J. Exp. Med. 36, 301-320

Teufel, P., 1968:

Untersuchungen über die Züchtung von Influenza A-Equi-Virus in der Zellkultur.

Diss. Med. vet., München

Tizard, I., 1982:

Serological assays.

J. Am. vet. med. Ass. 181, 1162-1165

Tijssen, P., 1985:

Practice and theory of enzyme immunoassays.

In: Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology

Burdon, R.H., Knippenberg, P.H., (eds.), Elsevier, Amsterdam

Tobita, K., A. Sugiura, C. Enomoto, M. Furuyama, 1975:

Plaque assay and primary isolation of influenza A viruses in an established line of canine kidney cells (MDCK) in the presence of trypsin.
Med. Microbiol. Immunol. 162, 9-14

Tobita, K., 1975:

Permanent canine kidney (MDCK) cells for isolation and plaque assay of influenza B viruses.
Med. Microbiol. Immunol. 162, 23-27

Tumova, B., A. Stumpa, J. Zakopal, D. Veznikova, J. Mensik, 1980:

Persistence in nature of influenza virus A/eq/Praha/56(Heq1Neq1).
Acta virol. 24, 63-67

Van Deusen, R.A., V.S. Hinshaw, D.A. Senne, D. Pellacani, 1983:

Micro neuraminidase-inhibition assay for classification of influenza A virus neuraminidase.
Avian Dis. 27,

Varghese, J.N., W.G. Laver, P.M. Colman, 1983:

Structure of the influenza virus glycoprotein antigen neuraminidase at 2.9 Å resolution.
Nature 303, 35-40

Webster, R.G., W.G. Laver, G.M. Air, G.C. Schild, 1982:

Molecular mechanisms of variation in influenza viruses.
Nature 296, 115-121

Webster, R.G., L.E. Brown, W.G. Laver, 1984:

Antigenic and biological characterization of influenza virus neuraminidase (N2) with monoclonal antibodies.
Virology 135, 30-42

Wiley, D.C., I.A. Wilson, J.J. Skehel, 1981:

Structural identification of the antibody-binding sites of Hong Kong influenza hemagglutinin and their involvement in antigenic variation.
Nature 289, 373-378

Wilson, I.A., J.J. Skehel, D.C. Wiley, 1981:

Structure of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3Å resolution.
Nature 289, 366-373

Wraith, D.C., A.E. Vessey, B.A. Askonas, 1987:

Purified influenza virus nucleoprotein protects mice from lethal infection.
J. Gen. Virol. 68, 433-440

Wraith, D.C., B.A. Askonas, 1985:

Induction of influenza A virus cross-reactive cytotoxic T cells by a nucleoprotein/haemagglutinin preparation.
J. Gen. Virol. 66, 1327-1331

Yamagishi, H., T. Nagamine, K. Shimoda, S. Ide, Y. Igarashi, I. Yoshioka, M. Matumoto, 1981:

Infectivity assay and neutralization test for equine influenza virus in microplate cell culture.
Vet. Microbiol. 6, 309-315

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. mult. A. Mayr danke ich herzlich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die Überlassung des Themas.

Herrn Dr. W. Eichhorn danke ich für die Betreuung der Arbeit und die bereitwillige Unterstützung.

Frau A. Pfleger danke ich für die Einarbeitung und die gute Zusammenarbeit. Allen Mitarbeitern der Isolierstation danke ich für das angenehme Arbeitsklima und die stete Unterstützung.

Lebenslauf

Am 20.5.1960 wurde ich, Otto Michael Schumm, als Sohn des Finanzbeamten Otto Schumm und seiner Frau Maria, geb. Groß, in Bad Mergentheim geboren.

Nach 4 Jahren Grundschule (1966-69) und einem Jahr Hauptschule trat ich auf das Deutsch-Ordens-Gymnasium Bad Mergentheim über. Von 1975-80 besuchte ich dann das Peutinger Gymnasium in Ellwangen/Jagst, wo ich 1980 das Abitur ablegte.

Nach Ableistung des Zivildienstes begann ich im Wintersemester 1981/82 das Tiermedizinstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität in München. Am 30. Juli 1987 schloß ich das Staatsexamen ab.

Im Oktober 1987 begann ich mit der Bearbeitung der vorliegenden Dissertation

Mit Geltung vom 12. November 1987 wurde mir die Approbation als Tierarzt erteilt.

